

**JULIANO VOGAS PEIXOTO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E  
FUNCIONAL DO TESTÍCULO DE PERIQUITOS AUSTRALIANOS  
(*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805)**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária,  
para obtenção do título de *Doctor  
Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

**JULIANO VOGAS PEIXOTO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E  
FUNCIONAL DO TESTÍCULO DE PERIQUITOS AUSTRALIANOS  
(*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2010.

---

Prof. José Domingos Guimarães  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Denise Calisto Bongalhardo

---

Prof. Deiler Sampaio Costa

---

Prof. Sérgio Luis P. da Matta

---

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus amados pais José Luiz e Jucelem.

Ao meu irmão Guilherme.

E a todos os meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus. Sem Você nada teria sido possível.

Aos meus pais José Luiz e Jucelem, amparo e refúgio. Amo vocês.

Ao meu irmão Guilherme, fiel escudeiro. Com a sua presença foi mais fácil vencer.

A todos os meus primos e tios que me acompanharam e torceram por mim todos esses anos. Obrigado por serem minha família. Não haveria melhor.

Ao Professor Tarcízio, grande homem, cuja voz sempre transmite segurança. Nunca me esquecerei de sua fala: “Ninguém mexe com meus orientados que eu viro um leão.”

Se quem achou um amigo, achou um tesouro, eu já estou milionário! Valeu por fazerem parte da minha vida! Aos amigos da Capela-UFV, de Viçosa, de Valão do Barro e de tantos outros lugares.

A minha e tão amada família do Grupo Católico de Estudo Bíblico SEMENTE: Ana Cris, Samuel, Luiz Henrique, Gisely, Monizy, Nathália, Val, Flávio, Elisa, Nínive, André, Vivi, Renato, Mirian, e todos aqueles que passaram por lá. Vocês são peças fundamentais em minha vida. Nosso coração terá sempre uma pontinha verde.

Ao Samuca e Ana Cris. Vocês confirmaram que família é pra todo e qualquer momento. Deus os abençoe sempre. Valeu amigos.

Ao CETAS-UFV (Centro de Triagem de Animais Silvestres) por me tornar Veterinário de verdade e por exercer tão bela função pela proteção dos animais silvestres.

A todos os estagiários do CETAS. Vocês fazem a vida se tornar mais leve e divertida.

Aos amigos pós graduandos orientados do Professor Tarcízio: Mariana, Carlão, Natasha, Grazi, Marcos, Moacir, Rafael (Mãozinha), Gê, Thyara e Pamella. Obrigado por tudo.

Aos amigos Mariana, Gê, Mãozinha, Marcos, Carlão, Vinícius, Isabela e Natalia por doarem tanto de seu tempo para me ajudarem no desenvolvimento do projeto.

Natalia, minha fiel escudeira. Excelente condicionadora de aves. Me mostrou que com paciência e conhecimento se vai longe num campo tão pouco explorado.

Bruna, meu braço direito. O que seria de mim sem você. Sua amizade, seus preciosos conselhos, seu tempo gasto pra me ajudar. Serei eternamente grato a você.

Néia, guerreira de laboratório. Como é fácil gostar de você. Valeu pela amizade, perseverança e confiança. Deus ilumine sempre seus caminhos.

Ao Professor Sérgio da Matta. Sou um admirador seu. Sempre disposto a ajudar. Escancarou as portas do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, para concretizar meu trabalho. Seus comentários foram valiosos. Seu modo de lidar com as pessoas é exemplar. Vou copiar.

Aos Professores José Domingos (JD) e Eduardo Paulino pelos valiosos conselhos. Esse projeto foi nosso e ainda renderá bons frutos.

Ao Professor Cláudio Fonseca pela amizade e disposição em ajudar sempre. Obrigado por confiar em mim.

Ao professor Jorge Dergan “capitão do Beagle” - Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Biologia Animal da UFV e sua tripulação. Em especial ao Fred e Udson por me ajudarem sempre. Vocês me receberam de braços abertos e merecem todo o meu respeito e carinho.

Aos Professores Denise Bongalhardo e Deiler Sampaio, por contribuírem com meu trabalho.

É certo: Deus coloca anjos em nossa vida. Assim foram Morgana e Sílvia. Companheiras diárias na luta pela finalização de nossos trabalhos. Cada um com sua tese, mas cada tese contando com nós três. Vocês foram suporte, força, perseverança e ânimo. Vocês merecem o céu.

Ter amigo inteligente são outros quinhentos, né Flavio e Elisa? Valeu pela ajuda com a estatística. Só vocês mesmo para deciframos tantos números e mostrar a beleza que fica escondida por detrás deles.

A minha grande amiga e *teacher* Júlia, que não mediu esforços para me ajudar com o *abstract*.

Aos companheiros de república, Juninho, Luerly e Lucas. Vocês também foram parte da minha família.

Dani, você caiu do céu quando eu mais precisava de ajuda. Você é exemplo pra mim. Obrigado mesmo, do fundo do meu coração.

Mariana. Você foi demais. Toda a minha tese tem o dedo seu. Não seria assim se não fosse você. Seu futuro vai ser brilhante.

Marli, obrigado por me ajudar nessa empreitada. Sua alegria e disposição em ajudar me marcaram. Deus te abençoe.

Maytê, grande amiga. Seus conselhos foram inestimáveis. Ainda bem que eles foram de graça, senão não haveria dinheiro no mundo para pagá-los. Obrigado por ser amparo e força em tantos momentos.

Vinícius, Isabela, Letícia e Monique, obrigado por doarem o pouco de tempo que tinham para me ajudar.

Fernandinha, Deus te pague em dobro por toda ajuda.

Anabela, suas palavras e orações foram refrigério para minha alma atribulada. Muito obrigado.

A amiga Divina do setor de esterilização do Hospital Veterinário. Obrigado pela ajuda e pelas palavras de incentivo. Você é uma pessoa maravilhosa.

A minha querida Rose, secretária da pós graduação. O que você fez por mim e todos pós graduandos não tem preço. Deus te abençoe dez vezes mais. Aprendi com você a ajudar o próximo sem titubear.

A todos os funcionários do Departamento de Veterinária que sempre se dispuseram a me ajudar e incentivar. Ao Geraldinho, Sérgio e Luciano por quebrar muitos galhos para mim.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal de Viçosa por ter sido um ambiente de crescimento para mim.

Ao Departamento de Veterinária onde cresci como pessoa, pesquisador e Veterinário.

Se eu me esqueci de você, me perdoe. Você também fez parte desse trabalho. Obrigado por tudo.

A todos os periquitos australianos em especial ao Azul, Verde e Brasil. Sem eles esse trabalho não seria realizado.

Eternamente grato.

## **BIOGRAFIA**

JULIANO VOGAS PEIXOTO, filho de José Luiz Dias Peixoto e Jucelem Vogas Peixoto, irmão de Guilherme Vogas Peixoto, nasceu em 10 de dezembro de 1980, em Cordeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Residente em Valão do Barro, interior do Estado do Rio de Janeiro, concluiu o Ensino Fundamental no Colégio Estadual Januário de Toledo Pizza em 1995, nesta mesma localidade.

Em 1996 ingressou no sistema GRAFITE/SEI, Município de Itaocara, Estado do Rio de Janeiro, onde realizou os estudos do Ensino Médio.

Em fevereiro de 2000 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais, no qual se graduou em janeiro de 2005.

Em março de 2005, ingressou no Mestrado do Programa de Pós graduação em Medicina Veterinária com área de concentração em Morfologia, pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais, tendo defendido sua dissertação em novembro de 2006.

Em fevereiro de 2007, ingressou no Doutorado do Programa de Pós graduação em Medicina Veterinária com área de concentração em Morfofisiologia da Reprodução de Animais Domésticos e Selvagens, pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais, tendo defendido sua tese em fevereiro de 2010.

## CONTEÚDO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 - Família Psittacidae – <i>Melopsittacus undulatus</i> .....	1
1.2 - Reprodução assistida.....	2
1.3 - Órgãos reprodutores masculinos das aves.....	3
1.4 – Espermatogênese.....	5
1.5 - O compartimento tubular e as células de Sertoli.....	6
1.6 - O compartimento intertubular e as células de Leydig.....	7
1.7 - Ciclo do epitélio seminífero.....	8
1.8 - Estádios do epitélio seminífero.....	9
2.0 – OBJETIVOS.....	10
3.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
<b>CAPÍTULO I:</b> Criopreservação de sêmen de periquito australiano ( <i>Melopsittacus undulatus</i> SHAW, 1805) em três meios com diferentes concentrações de glicerol e dois métodos de congelamento.....	18
RESUMO.....	18
1 – INTRODUÇÃO.....	19
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 – Animais.....	20
2.2 - Coleta de sêmen.....	21

2.3 - Avaliação macroscópica.....	21
2.4 - Meios diluidores.....	21
2.5 - Avaliação microscópica.....	22
2.6 – Resfriamento.....	23
2.7 – Congelamento.....	23
2.8 – Descongelamento.....	25
2.9 - Análise estatística.....	26
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1 - Coleta e avaliação macroscópica de sêmen.....	26
3.2 - Diluição e avaliação microscópica do sêmen.....	28
3.3 - Análise morfológica do sêmen.....	31
3.4 - Resfriamento do sêmen.....	33
3.5 - Congelamento de sêmen.....	34
4- CONCLUSÕES.....	41
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
<b>CAPÍTULO II: Avaliação histológica e funcional dos túbulos seminíferos de periquito australiano (<i>Melopsittacus undulatus</i> SHAW, 1805).....</b>	<b>45</b>
RESUMO.....	45
1 – INTRODUÇÃO.....	47
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 – Animais.....	48
2.2 - Aplicação de bromodeoxiuridina (BrdU) e coleta de testículo.....	49
2.3 - Processamento histológico.....	49
2.4 - Análise morfológica testicular.....	50

2.5 - Análise estatística.....	52
3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1 - Sazonalidade e índice gonadosomático.....	53
3.2 - Testículo e túbulo seminífero.....	54
3.3 - Estádios do ciclo do epitélio seminífero.....	57
3.4 - População do epitélio e rendimento intrínseco da espermatogênese.....	65
3.5 - Duração do ciclo e produção espermática diária.....	68
4.0 – CONCLUSÕES.....	71
5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

## RESUMO

PEIXOTO, Juliano Vogas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805).** Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Coorientadores: José Domingos Guimarães e Eduardo Paulino da Costa.

O periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) de vida livre habita as regiões áridas e semi-áridas do interior da Austrália. Sua criação em cativeiro teve início na metade do século XIX devido sua grande adaptabilidade e reprodutibilidade. É considerado pela IUCN (2009) como “Least Concern”, ou seja, sem ameaça de extinção. Assim como para a maioria das aves silvestres, poucos são os estudos sobre a morfofisiologia reprodutiva de psitacídeos, levando à escassez de conhecimentos sobre a reprodução dessas aves. O desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida em espécies modelos que não se encontram em vias de extinção é essencial para extrapolação metodológica na utilização de biotécnicas reprodutivas. Os animais do presente experimento foram alocados nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa. A coleta de sêmen foi realizada três vezes por semana via massagem digital na porção dorso caudal da cavidade celomática. O sêmen foi coletado das papilas dos ductos deferentes, na parede da cloaca, por meio de tubos de micro hematócrito graduados não heparinizados. O volume de sêmen coletado foi diluído em solução de Ringer com lactato, e os espermatozóides foram classificados quanto à motilidade e vigor, sendo também calculados a concentração espermática e o percentual de anormalidades. Posteriormente as amostras foram rediluídas nos meios Lake<sup>®</sup>, TRIS-citrato-gema de ovo e TES-TRIS para teste de resfriamento a 5°C. Para o teste de congelamento, amostras foram fracionadas em 2 alíquotas contendo 6 e 11% de glicerol. Uma amostra de cada tratamento foi submetida a dois processos de congelamento: uma curva rápida de resfriamento/congelamento e uma curva ultrarrápida de resfriamento/congelamento. Após o descongelamento foram considerados os mesmos parâmetros de análise para o sêmen a fresco, além do teste de termorresistência e dos testes hiposmótico, supravital e coloração por fluorescência para verificar a integridade de membrana. O meio Lake<sup>®</sup> apresentou melhores resultados para o resfriamento do sêmen após 24 horas. Não foram observados resultados

satisfatórios de motilidade, vigor e testes de integridade de membrana após o descongelamento das amostras nos diferentes protocolos. Foi ainda avaliado o processo espermatogênico de periquitos australianos. Quatro dias previamente à coleta dos testículos, em três animais foi aplicado 0,1 ml de bromodeoxiuridina via sistêmica. Os testículos foram coletados e processados segundo técnica rotineira para inclusão em resina e parafina. Cortes em resina foram corados com azul de toluidina e analisados com técnicas qualiquantitativas enquanto os cortes em parafina foram corados segundo técnica imunocitoquímica. Foram verificados índices indicativos de alta produção espermática, como índice gonadossomático (1,4%), proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (97%), diâmetro médio do túbulo seminífero (314  $\mu\text{m}$ ), altura do epitélio seminífero (96,7  $\mu\text{m}$ ), 12,4 metros de túbulo seminíferos por grama de testículo, reserva espermática por grama de testículo ( $551,7 \times 10^6$ ), produção espermática diária ( $171,3 \times 10^6$ ) e produção espermática diária por grama de testículo ( $342,7 \times 10^6$ ). O arranjo celular ao longo do ciclo do epitélio seminífero foi semelhante àquele descrito em mamíferos, sendo possível a definição de 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero. Semelhante as demais espécies de aves estudadas, cinco a nove áreas com estádios distintos foram observados em uma única secção transversal do túbulo seminífero conferindo a característica helicoidal da espermatogênese. A frequência relativa dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de periquitos australianos foi: estágio 1 (9,35); estágio 2 (5,33); estágio 3 (26,09); estágio 4 (11,06); estágio 5 (22,28); estágio 6 (16,17); estágio 7 (5,89) e estágio 8 (3,84). Os estádios pré divisionais somaram 40,8%, o divisional 11% e os estádios pós divisionais somaram 48,2% seguindo a mesma tendência encontrada em codornas. A duração do ciclo do epitélio seminífero em periquitos australianos foi de 1,66 dias, menor que em todos os mamíferos e aves estudadas. Nas áreas correspondentes ao estágio I do ciclo do epitélio seminífero de periquito australiano, foram observados em média 55,42 espermatogônias, 53,01 espermatócitos jovens, 44,68 espermatócitos velhos, 176,56 espermátides arredondadas e 7,06 células de Sertoli. Foi observada uma perda de aproximadamente 16% de espermatócitos durante a prófase meiótica. A perda registrada de espermátides arredondadas durante as divisões meióticas não foi significativa sendo que das quatro células esperadas, cerca de 3,95 espermátides foram produzidas. Cada célula de Sertoli no epitélio seminífero do periquito australiano foi capaz de sustentar e manter 46,72 células da linhagem germinativa, das quais 25,02 eram espermátides arredondadas.

## ABSTRACT

PEIXOTO, Juliano Vogas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Semen cyopreservation and histological and functional evaluation of testis of budgerigars (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805).** Advisor: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Co-Advisors: José Domingos Guimarães e Eduardo Paulino da Costa.

The budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) in a wild life lives in dry regions and semi-dry in the middle of Australia. Its captive breeding has started in the middle of the XIX century caused by its great ability of adaptation and reproduction. Its considered by the IUCN (2009) as "Least Concern", which means no instinction menace. As well as the major of exotic birds, there is just a few studies of the reproductive morphophysiology of psittaciformes, which comes with the scarcity knowledge of these birds reproduction. The development of assisted reproduction protocols in model species which are not in extinction routes is essential to methodologically expand the use of biothechnics of reproduction. The animals of the present experiment were located inside the Veterinary Hospital of The Federal University of Viçosa. The sperm collection had been done three times a week by digital messages in the celomatic cavity of the backflow. The sperm was collected from the vas deferens of the papillae, the wall of the cloaca, by the graduated micro tubes hematocrit not heparinized. The sperm volume collected were diluted in a Ringer with lactate solution, and the sperm were classified by their motility and sperm vigor, the sperm concentration was calculated too and the percentage of anomalies. Later samples were rediluted inside Lake<sup>®</sup>, TRIS-citrate-egg yolk and TES-TRIS to the cooling test at 5°C. In the freezing test, the samples were fractionated in 2 rates with 6 and 11% of glycerol. A sample of every treatment was subjected to two freezing processes: one fast curve of cooling/freezing and a real fast curve of cooling/freezing. After thawed the same parameter analysis of the fresh sperm were considered, above the thermoresistence test and the hypoosmotic test, supravital and coloring by fluorescence to check the membrane integrity. The Lake<sup>®</sup> portion showed better results to the cooling sperm after 24 hours. It was not observed any satisfactory motility result, sperm vigor and membrane integrity tests after the thawed samples at the different protocols. It was also evaluated the spermatogenesis process of budgerigar. Four days before the collection of the testicles, it was introduced 0,1ml of bromodeoxyuridine in the systemic route. The testicles were collected and processed by the routine technique to include resin and paraffin. Resin cuts were colored with blue toluidine and analyzed with qualitative and quantitative technique while the paraffin cuts were colored by the

immunocytochemistry technique. It was noticed many indicative rates of high sperm production, as gonadosomatic rate (1,4%) volumetric proportion in the seminiferous tubules (97%), medium diameter of the seminiferous tubules (314  $\mu\text{m}$ ), seminiferous epithelium height (96,7  $\mu\text{m}$ ), 12,4 meters of seminiferous tubules per gram of testicles, spermatid reservation per gram of testicles ( $551,7 \times 10^6$ ), spermatid daily production ( $171,3 \times 10^6$ ) and spermatid daily production per gram of testicle ( $342,7 \times 10^6$ ). The cell arrangement during the long cycle of the seminiferous epithelium was similar to the one described in mammals, being possible to define 8 stages of the seminiferous epithelium cycle. Similar to the other birds species already studied, five to nine areas with distinct stages were observed in only one cross section of the seminiferous tubule giving the spermatogenesis helical characteristic. The relative frequency of the eight stages of the seminiferous epithelium cycle in budgerigar was: stage 1 (9,35); stage 2 (5,33); stage 3 (26,09); stage 4 (11,06); stage 5 (22,28); stage 6 (16,17); stage 7 (5,89) e stage 8 (3,84). The predivisional stages totaled 40,8%, the divisional 11% and the postdivisional stages totaled 48,2% following the same tendency found in quails. The duration of the seminiferous epithelium cycle in budgerigar was about 1,66 days, less than all studied mammals and birds. In the corresponding area of the stage 1 of the budgerigar's seminiferous epithelium cycle, it was observed in average 55,42 spermatogonias, 53,01 young spermatocytes, 44,68 old spermatocytes, 176,56 rounded spermatid and 7,06 Sertoli cells. It was observed loss of approximately 16% of spermatocytes during the meiotic prophase. The registered loss of rounded spermatides during the meiotic division was not significant and that the four expected cells, around 3.95 spermatides were produced. Every Sertoli cell inside the budgerigar's seminiferous epithelium was able to support and to keep 46,72 germline cell, in which 25,02 were rounded spermatides.

## 1 - INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 - Família Psitacidae – *Melopsittacus undulatus*

A ordem Psitaciforme é considerada por parte dos pesquisadores como constituída por uma única família, a Psitacidae. Porém, alguns autores classificam-na em três grandes famílias: a Loridae, representada pelos lóris; a Cakatuidae, representada pelas cacatuas e a Psitacidae, composta pelos papagaios, araras, periquitos, jandaias e maracanãs (Collar, 1997; Sick, 1997).

As aves da família Psitacidae encontram-se amplamente distribuídas pelo globo terrestre, sendo encontradas desde áreas tropicais até regiões bastante frias. É composta por 78 gêneros e 332 espécies, sendo 148 encontradas no Novo Mundo e 184 no Velho Mundo. Cerca de 100 delas estão na América do Sul sendo 80 encontradas no Brasil. Por isso o Brasil é considerado o local mais rico do mundo em representantes desta família, onde vivem ainda seus maiores representantes, as araras. Em documentos antigos, como mapas datados de 1500, o Brasil tem sido referido como a “Terra dos papagaios” (*Brasilia sive terra papagallorum*) (Collar, 1997; Sick, 1997).

Segundo o Censo Mundial de Psitaciformes ameaçados de extinção, realizado em 1994, 86 (26%) das 332 espécies de psitacídeos do mundo estão em risco de extinção, sendo 36 altamente ameaçadas (Birdlife, 2000). Esta proporção é acentuada em relação as demais famílias de aves, principalmente devido à peculiar vulnerabilidade dos papagaios à contínua destruição de seus habitats e à calamitosa captura de exemplares na natureza para o tráfico ilegal (Birdlife, 2000). Os casos mais críticos são o da ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*), considerada extinta na natureza e com aproximadamente 60 indivíduos em cativeiro, sendo 8 no Brasil (IBAMA, 2004), e o da arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*), com aproximadamente 455 indivíduos de vida livre na região conhecida como Raso da Catarina, ao nordeste do estado da Bahia (Olmos, 2005).

Poucas famílias possuem características tão específicas, sendo imediato o reconhecimento de um exemplar de um psitacídeo. Dentre elas, o bico curto de base larga, com a maxila intensamente curvada e ajustada sobre a mandíbula, extremamente móvel, possibilitando variados movimentos. A língua e a estrutura muscular da maxila são altamente desenvolvidas, estando intimamente relacionadas à grande força e controle para apreensão, preparo e ingestão de alimento (Sick, 1997). Segundo Collar

(1997), estes animais apresentam cabeça sempre proporcionalmente grande e larga e o pescoço curto. Os membros pélvicos são zigodáctilos, com escamas granulares e invariavelmente curtos. Adicionalmente, existe a tendência de desaparecimento da glândula uropigiana nos psitacídeos neotropicais, sendo que os gêneros *Amazona*, *Pionus* e *Brotogeris* não a possuem (Sick, 1997).

O periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) de vida livre habita as regiões áridas e semi-áridas do interior da Austrália. É uma espécie nômade que vive em grandes bandos, cuja movimentação ocorre em função da disponibilidade de sementes de gramíneas, sua principal fonte de alimento (Collar, 1997). Sua criação em cativeiro teve início na metade do século XIX e devido sua grande adaptabilidade e reprodutibilidade em cativeiro, hoje pode ser encontrado sendo criado em lares do mundo inteiro (BirdLife International, 2008). É considerado pela IUCN (2009) como *least concern*, ou seja, sem ameaça de extinção, uma vez que não existem perspectivas de declínio de 30% em sua população em dez anos. Apesar de ser encontrado apenas na coloração verde clara em vida livre, em cativeiro a seleção de mutações deu origem a diversas cores como azul, branco, amarelo e seus matizes. É um animal exótico considerado doméstico, não havendo necessidade de legalização junto ao IBAMA para sua exploração comercial (Periquitos Australianos, 2009).

Assim como para a maioria das aves silvestres, poucos são os estudos sobre a morfofisiologia reprodutiva de psitacídeos, levando à escassez de conhecimentos sobre a reprodução dessas aves. O desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida em espécies modelos que não se encontram em vias de extinção é essencial para extrapolação metodológica garantindo maior possibilidade de proliferação e sobrevivência daqueles animais ameaçados. A utilização de biotécnicas reprodutivas, associadas à preservação do seu habitat natural, pode possibilitar o aumento do número de indivíduos, auxiliando a sobrevivência da espécie.

## **1.2 - Reprodução assistida**

Muitos programas de reprodução *in situ* têm utilizado resultados de técnicas reprodutivas em galos domésticos como ponto de partida para a adaptação destas técnicas às aves silvestres, como *Falco sparverios* (Bird e Lagüe, 1976), *Amazona ventralis* (Brock, 1991), *Spheniscus magellanicus* (O'brien et al., 1999), *Anas acuta*

(Penfold et al., 2001), *Melopsittacus undulatus* (Samour, 2002), *Myiopsitta monachus* (Anderson et al., 2002) entre outras várias espécies de aves de vida livre.

Uma destas técnicas de reprodução assistida desenvolvida em galo doméstico (Burrows e Quinn, 1935) é a coleta de amostras de sêmen por meio de massagem dorso abdominal. Esta técnica consiste em manipulação externa da cavidade celomática da ave com os dedos polegar e indicador, realizando movimentos direcionados crânio caudalmente durante por 1 a 2 minutos. Subsequentemente uma pressão é realizada nas laterais da parede da cloaca com exposição das papilas dos ductos deferentes, a partir das quais se coleta o sêmen (Burrows e Quinn, 1935; Brock, 1991; Anderson et al., 2002; Samour, 2002).

A criopreservação de sêmen é um dos métodos para preservação do potencial genético de aves domésticas e silvestres estudados. Tem sido demonstrado que o sêmen de aves silvestres (Gee e Sexton, 1990; Blanco et al., 2000) e de diferentes raças de galinhas (Tselutin et al., 1999; Tai et al., 2001; Lukaszewicz, 2002) pode ser congelado com sucesso e que satisfatórios níveis de fertilidade podem ser obtidos posteriormente com inseminação artificial, como observado em *Chlamydotis undulata undulata* (Hartley et al., 1999), *Gallus gallus domesticus* (Tselutin et al., 1999), *Anas acuta* (Penfold et al., 2001), *Melopsittacus undulatus* (Samour, 2002) e *Phasianus colchicus* (Herrera et al., 2005). O sucesso no congelamento depende de muitos fatores, como meios diluidor e criopreservador, tempo de equilíbrio, curva de congelamento e temperatura de descongelamento (Fujihara e Buckland, 1987; Blanco et al., 2000). Além disso, a qualidade do sêmen é influenciada por características inerentes ao animal, como espécie, idade, sazonalidade reprodutiva, método e frequência de coleta de sêmen (Noirault e Brillard, 1999; Zahraddeen et al., 2005).

### **1.3 - Órgãos reprodutores masculinos das aves**

Os órgãos reprodutores dos machos das aves são constituídos bilateralmente por testículos, epidídimos e ductos deferentes, localizados no interior da cavidade celomática (Jones e Lin, 1993). Os testículos estão suspensos por uma pequena prega peritoneal, o mesórquio, situando-se medialmente ao pólo cranial dos rins. Em alguns machos, e na maioria das fêmeas em procriação, as gônadas podem estender-se sob todo o pólo cranial dos rins, inclusive às adrenais (Pollock e Orosz, 2002). O testículo é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular, envolta pela

túnica *vaginalis*, que se trata de uma extensão do peritônio. Ademais, a túnica albugínea não envia septos conjuntivos para o centro dos testículos dividindo-o em lóbulos, como ocorre em mamíferos (Lofts e Murton, 1973; Jones e Lin, 1993).

Em espécies de reprodução sazonal em zonas temperadas, o testículo está sujeito a uma grande variação anual em seu tamanho, em algumas chega a ser superior a 400 vezes, havendo uma grande variação do índice gonadossomático (peso corporal alocado em massa testicular) ao longo do ano. França e Russel (1998) afirmam que o tamanho testicular está diretamente relacionado com a produção espermática. Este aumento considerável de tamanho pode confundi-los com neoplasias, em radiografias (Harrisson, 1994). O testículo esquerdo é ligeiramente maior que o direito, particularmente em pássaros jovens (Jones e Lin, 1993; Harrisson, 1994; Evans, 1996). Os testículos são geralmente brancos quando ativos e tornam-se escuros em estado de repouso reprodutivo.

A correlação entre o tamanho dos testículos e o comportamento reprodutivo é proposta por diversos pesquisadores a muitas espécies de mamíferos (Kenagy e Trombulak, 1986; Breed e Adams, 1992; Short, 1997). Os testículos são relativamente maiores em animais com comportamento promíscuo ou poliândrico e relativamente pequenos nos machos com sistema de acasalamento monogâmico ou poligínico. Isto se deve ao fato de, no primeiro caso, a competição para produção de progênie ser pela quantidade de sêmen depositado no trato genital feminino, o que torna necessário maior produção espermática. Por outro lado, na segunda situação, a competição entre os machos é pelo direito ao cruzamento, sendo a manifestação comportamental de dominância sobre os oponentes o aspecto mais importante (Short, 1997).

Os epidídimos não são facilmente visualizados, enquanto os tortuosos ductos deferentes surgem próximos à porção medial dos testículos e correm paralelos aos ureteres, desembocando caudalmente no interior da cloaca, onde formam o ducto ejaculatório. Os ductos deferentes são bastante evidentes em época reprodutiva, mostrando-se ingurgitados e tortuosos à celioscopia, facilitando a sua diferenciação dos ureteres (Harrisson, 1994). Em periquitos australianos e passeriformes terminam em duas estruturas ovaladas, que em conjunto formam a *Seminal glomera*, na parede lateral de cada antímero do urodeu, responsáveis pelo armazenamento de sêmen (King e McLelland, 1984; Samour, 2002;).

Glândulas acessórias macroscópicas estão ausentes nos órgãos reprodutores em psitacídeos, sendo o fluido seminal produzido pelo epidídimo e ductos deferentes (King

e McLelland, 1984; Kirby e Froman, 2000). Periquitos australianos não apresentam *falus*, estrutura copuladora análoga ao pênis dos mamíferos, diferentemente de outras aves como galos e perus com *falus* não protúndil e patos e avestruzes com *falus* protúndil (Harrison, 1994).

#### **1.4 - Espermatogênese**

A espermatogênese é um evento dinâmico, sincrônico e bem organizado, no qual uma célula tronco diplóide, a espermatogônia, sofre diferenciação em várias etapas até ser liberada como célula haplóide, o espermatozóide, no lume do túbulo seminífero. Enquanto nos mamíferos estudados este processo dura entre 40 e 60 dias (França e Russell, 1998), nas aves é um processo extremamente rápido com apenas 12,8 dias em codornas (Lin e Jones, 1992). Este processo é organizado em três distintas fases, baseado em considerações morfológicas e funcionais. Na fase mitótica, também denominada espermatogonial ou proliferativa, as espermatogônias sofrem sucessivas divisões mitóticas gerando células que renovarão o estoque de células tronco e uma geração de células que continuarão no processo de diferenciação. A fase meiótica é caracterizada pela população de espermatócitos, nos quais o material genético é duplicado e recombinado. Por último a fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides sofrem significativas modificações, transformando-se em células muito especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (Russell et al., 1990a). Cada um destas fases dura aproximadamente 1/3 do processo espermatogênico.

O rendimento da espermatogênese não alcança os 100% de eficiência. Um exemplo é o número teórico de 4000 espermatozoides produzidos a partir de uma única espermatogônia em ratos, o que não se traduz na prática. Isso provavelmente se deve ao fato da ocorrência de morte celular programada, também conhecida como apoptose, em células defeituosas e para limitar as células germinativas a um número que pode ser suportado pelas células de Sertoli disponíveis (Huckins, 1978; De Rooij e Janssen, 1987; De Rooij e Lok, 1987; Sharpe, 1994; De Rooij, 1998). Assim, mesmo em espécies com alta produção espermática, as perdas celulares durante as divisões espermatogoniais podem ser consideravelmente altas, visto que o número de células entrando na fase meiótica deve ser ajustado para o número que a célula de Sertoli pode suportar (Roosen-Runge, 1973; Sharpe, 1994). Ainda de acordo com Roosen-Runge

(1973), o grau e o modo de degeneração das células germinativas é espécie-específico, mas em geral ocorre durante as divisões mitóticas e meióticas. Degenerações de espermatídes alongadas raramente são observadas (Russell e Clermont, 1977).

### **1.5 - O compartimento tubular e as células de Sertoli**

Assim como nos mamíferos, nas aves os túbulos seminíferos formam uma massa enovelada, porém, ao contrário daqueles, são anastomosados, formando uma complexa cadeia de comunicação ao longo do testículo (Lofts e Murton, 1973). Segundo Jones e Lin (1993), a superfície interna dos túbulos seminíferos das aves é recoberta por um epitélio de células não germinativas de sustentação ou células de Sertoli e quatro tipos básicos de células germinativas: espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermatídes, todas envolvidas no processo de espermatogênese.

As abordagens mais utilizadas como indicadores da atividade espermatogênica em experimentos que envolvam a função testicular, utilizam a mensuração do diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e a quantificação da proporção volumétrica dos diferentes componentes do parênquima testicular, uma vez que estes são diretamente relacionados com a produção espermática (Attal e Courot, 1963; Godinho e Cardoso, 1979; Sinha-Hikim et al., 1988; Russell et al., 1994; Muñoz et al., 1998; França e Cardoso, 1998). Porém, os melhores indicadores produtivos espermatogênicos são o índice de células de Sertoli, que se traduz na quantidade de células da linhagem espermatogonial mantidas por uma célula de Sertoli e a produção diária de espermatídes alongadas que quando confeccionadas por grama de testículo, anulam as diferenças de tamanho corporal e testicular, permitindo uma comparação mais acurada entre as espécies animais (Paula, 1999).

As células de Sertoli são responsáveis pela nutrição das células germinativas, secreção de fluidos e proteínas, liberação de espermatozóides no lume tubular, fagocitose de células germinativas em apoptose e do excesso de citoplasma das espermatídes em espermiogênese, além de função mediadora da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese (Paula, 1999). Estudos sobre a estrutura das células de Sertoli de galo e pato indicaram que são semelhantes as de mamíferos, sendo facilmente distinguidas no epitélio germinativo pelo grande tamanho e forma irregular (Jones e Lin, 1993). Assim como em mamíferos, as células de Sertoli além de atuarem no

suporte físico para as células germinativas são também responsáveis pela formação de uma barreira hematotesticular, por meio de junções citoplasmáticas complexas caracterizadas por zonas de oclusão e desmosomas (Pelletier, 1990).

O número de células de Sertoli por testículo parece ser o grande mandatário na determinação da produção espermática e no tamanho do testículo (Orth et al., 1988; Hess et al., 1993; França et al., 1995). Prerrogativa esta, baseada na capacidade limite das células de Sertoli para manutenção de um determinado número de células germinativas para cada espécie além do fato da estabilidade do número de células de Sertoli após a puberdade (Steinberger e Steinberger, 1971; Orth, 1982; Orth et al., 1988; França e Russell, 1998). Desta forma, o número de células germinativas suportado por uma única célula de Sertoli (índice de células de Sertoli) é o melhor indicativo da eficiência funcional das células de Sertoli (Russell e Peterson, 1984; França e Russell, 1998). Ainda, levando-se em consideração que a população de células de Sertoli é estável ao longo dos estádios do ciclo, estas células têm sido utilizadas numericamente como ponto de referência para a quantificação e a correção de contagens de células germinativas (Clermont e Morgentaler, 1955; Bustos-Obregon, 1970; Shakkebak e Heller, 1973; França, 1991).

Um ciclo testicular evidente é observado em aves sazonais. Assim, durante o período de quiescência sexual, o epitélio germinativo consiste de uma única camada de espermatogônias e células de Sertoli, não sendo observado um lume tubular evidente. Entretanto, com o advento da estação reprodutiva, uma recrudescência da atividade mitótica nas espermatogônias tronco causa a propagação de numerosas células germinativas, as quais maturam sucessivamente até o completo restabelecimento da atividade espermatogênica (Lofts e Murton, 1973).

## **1.6 - O compartimento intertubular e as células de Leydig**

Nas aves o compartimento intertubular é formado por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, espaços linfáticos e células intersticiais ou de Leydig, principais responsáveis pela produção dos hormônios sexuais masculinos. Além disso, grande número de melanoblastos podem ser observados neste compartimento em algumas espécies, conferindo uma coloração negra ou acinzentada a este órgão (Lofts e Murton, 1973; Jones e Lin, 1993; Crosta et al., 2003). Com a proliferação sazonal observada no epitélio germinativo e consequente expansão dos túbulos seminíferos no período

reprodutivo, o tecido intersticial torna-se confinado a restritos espaços intertubulares. Já nos animais fora da estação reprodutiva o tecido intertubular torna-se mais facilmente visualizado (Lofts e Murton, 1973). As células de Leydig das aves sofrem um ciclo de mudanças histofisiológicas bem definido que acompanha o ciclo testicular. Aparentemente as células de Leydig são derivadas de células semelhantes a fibroblastos nas áreas intertubulares e tornam-se mais globulosas, com grande quantidade de gotículas de colesterol no citoplasma, durante a fase de preparação para a atividade reprodutiva. Já no período de máxima atividade reprodutiva estas células permanecem globulosas, mas perdem grande parte das gotículas lipídicas acumuladas. Após a fase reprodutiva o testículo diminui a atividade espermatogênica e androgênica, reduzindo drasticamente a área de túbulos seminíferos e o número total de células de Leydig (Lofts e Murton, 1973; Cesário, 1994).

### **1.7 - Ciclo do epitélio seminífero**

Na mesma região do epitélio seminífero podem-se observar gerações concomitantes formando quatro a cinco camadas concêntricas da base ao lume tubular, de forma que a geração mais desenvolvida é liberada no lume ao mesmo tempo em que uma nova geração é formada em sua base. Assim, uma geração recém formada necessitará de quatro a cinco etapas ao longo da espessura epitelial para a sua liberação como espermatozóide no lume tubular. O período de tempo observado entre cada uma destas etapas é denominado ciclo do epitélio seminífero e desta forma, entre quatro e cinco ciclos são necessários para que uma geração complete todo o processo espermatogênico (Leblond e Clermont, 1952). Em mamíferos é considerada uma constante biológica, com variações apenas interespecíficas, estando sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998), não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (Clermont, 1972; Amann e Schanbacher, 1983). Para o cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero é utilizado um marcador celular, como a timidina triciada que é injetada diretamente no parênquima testicular (Cardoso e Godinho, 1982; França, 1991) ou a bromodeoxiuridina (BRDU) que além desta via, permite aplicações sistêmicas (Ellwart e Dormer, 1985). O marcador incorpora-se ao DNA em duplicação no núcleo das células em interfase, no momento da injeção, ou seja, os diferentes tipos espermatogoniais e os espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno. Como os pré-leptótenos/leptótenos são os últimos tipos celulares a

incorporarem timidina triciada ou BRDU em seus núcleos, os mesmos são utilizados como ponto de referência para a determinação do cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero, em associação com a frequência dos estádios percorridos após diferentes tempos de injeção do radioisótopo (Clermont, 1972; França e Cardoso, 1998). Aproximadamente 4,5 e 4,75 ciclos são requeridos para que o processo espermatogênico se complete respectivamente em mamíferos e codornas, ou seja, a liberação dos espermatozóides no lume do túbulo seminífero, a partir de uma espermatogônia A<sub>1</sub> (Amann e Schanbacher, 1983; Lin et al., 1990; França e Russell, 1998).

### **1.8 - Estádios do epitélio seminífero**

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Na grande maioria dos mamíferos estudados, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar e usualmente existe somente um estágio por secção transversal de túbulo seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990b). Porém nas aves e algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios assume uma conformação helicoidal podendo ser encontradas várias associações celulares em um mesmo corte transversal de um túbulo seminífero (Lin e Jones, 1990). Dessa forma, enquanto uma associação celular pode se estender por milímetros em túbulos seminíferos de um rato (Perey et al., 1961), nas aves, vários estádios ocupam uma mesma região do túbulo seminífero em diferentes proporções de área (Jones e Lin, 1993). A ocorrência de até 12 associações celulares em uma secção transversal de um túbulo seminífero de codorna indica que a área ocupada por um estágio é muito pequena (Lin e Jones, 1990). Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermátides e na presença de figuras de divisões meióticas (Roosen-Runge e Giesel Jr., 1950; Courrot et al., 1970; Berndtson, 1977; Ortavant et al., 1977; Guerra, 1983; França, 1991). Este sistema, designado como método da morfologia tubular por Berndtson (1977), permite a obtenção de oito estádios do ciclo. Outra classificação, designada como método do sistema acrossômico, é baseada nas características das espermátides, em particular na forma do núcleo e no desenvolvimento do acrossoma. Com este método, no qual os

estádios são arbitrariamente definidos, o número de estádios para cada espécie é variado (Aire et al., 1980; Russell et al., 1990b; França e Russell, 1998). Baseando-se nessas duas metodologias em conjunto, Lin e Jones (1990) descreveram 10 diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero para a codorna.

A determinação da taxa de produção espermática nas diferentes espécies domésticas tem sido usada com o objetivo de melhorar o manejo e a exploração dos reprodutores de destacado potencial genético (Amann, 1970; Amann e Schanbacher, 1983; França, 1991). A quantificação e avaliação dos espermatozoides ejaculados permitem a análise da produção e correlação com achados histológicos e biométricos testiculares em uma dada espécie, o que leva o desenvolvimento de técnicas de criopreservação de sêmen. Em espécies ameaçadas de extinção esta prática torna-se indispensável para a adequação de biotécnicas reprodutivas, importantes na preservação destas espécies, tais como formação de bancos de germoplasma e translocação de material genético entre indivíduos de vida livre e de cativeiro.

## **2.0 – OBJETIVOS**

Objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade seminal de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), assim como a resposta frente a diferentes meios diluidores e diferentes métodos de criopreservação utilizando distintas concentrações de um crioprotetor. Além de uma descrição detalhada do testículo e do processo espermatogênico desta espécie.

## **3.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aire, T.A., Olowo-okorum, M.O., Ayeni, J.S. 1980. The seminiferous epithelium in the guinea fowl *Numida meleagris*. Cell Tiss. Res. 205: 319-325.
- Amann, R.P. 1970. Sperm production rates. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (ed). The testis. New York: Academic Press. v. 1. pp. 433-482
- Amann, R.P., Schanbacher, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. J. Anim. Sci. Suppl. 57: 380-403.
- Anderson, S.J., Bird, D.M., Hagen, M.D. 2002. Semen characteristics of the quaker parakeet (*Myiopsitta monachus*). Zoo Biol. 21: 507-512.

- Attal, J., Courot, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Ann Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 3: 219-241.
- Berndtson, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.* 44: 818-883.
- Bird, D.M., Lagüe, P.C. 1976. Management practices for captive kestrels used in semen donors for artificial insemination. *Raptor Res.* 10: 92-96.
- Birdlife International. 2000. Threatened birds of the world. Cambridge: Lynx Editions and Bird Life International. 852p.
- Birdlife International. 2008. *Melopsittacus undulatus*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acessado em 23 de outubro de 2009.
- Blanco, J.M., Gee, G., Wildt, D.E., Donoghue, A.M. 2000. Species variation in osmotic cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. *Biol Reprod.* 63: 1164-1171.
- Breed, W.G., Adams, M. 1992. Breeding systems of spinifex hopping mice (*Notomys alexis*) and plains rats (*Pseudomys australis*): a test for multiple paternity within the laboratory. *Aus. J. Zool.* 40: 13-20.
- Brock, M.K. 1991. Semen collection ad artificial insemination in the hispaniolan parrot (*Amazona ventralis*). *J Zoo Wild Med.* 22:107-114.
- Burrows, W.H., Quinn, J.P. 1935. A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poult. Sci.* 14: 253-254.
- Bustos-Obregon, E. 1970. On Sertoli cell number and distribution in rat testis. *Arch. Biol.* 81: 99-108.
- Cardoso, F.M., Godinho, H.P. 1982. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. *Anim. Reprod. Sci.* 5: 231-245.
- Cesário, M.D. 1994. Fisiologia da reprodução de aves. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 141p.
- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52: 198-236.

- Clermont, Y., Morgentaler, H. 1955. Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. *Endocrinology*. 57: 369-382.
- Collar, N.J. 1997. Family Psittacidae (Parrots). In: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. Handbook of the birds of the world. Barcelona: Lynx Edicions. v.4. pp. 280-447.
- Courot, M., Hochereau-De-Reviere, M.T., Ortavant, R. 1970. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (ed). The testis. New York: Academic Press. v.1. pp. 339-432.
- Crosta, L., Gerlach, H., Bürkle, H.M., Timossi, L. 2003. Physiology, diagnosis, and diseases of the avian reproductive tract. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 6: 57-83.
- De Rooij, D.G. 1998. Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Path.* 79: 67-80.
- De Rooij, D.G., Janssen, J.M. 1987. Regulation of the density spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: I. Undifferentiated spermatogonia. *Anat. Rec.* 217: 124-130.
- Ellwart, E.; Dormer, P. 1985. Effect of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine (FdUrd) on 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with monoclonal BrdUrd antibody and by the BrdUrd/H. *Cytometry*. 6: 513-20.
- Evans, H.E. 1996. Anatomy of the budgerigar and other birds. In: Rosskopf Jr, W.J., Woerpel, R.W. Diseases of cage and aviary birds. 3 Ed. USA (Baltimore): Williams & Wilkins. pp. 79-162.
- França, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 185p.
- França, L.R., Cardoso, F.M. 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. *Tiss. Cell*. 30: 573-582.
- França, L.R., Ogawa, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L., Russell, L.D. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* 59: 1371-1377.

- França, L.R., Russell, L.D. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). Male reproduction. A multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Livingstone. pp.197-219.
- França, L.R., Ye, S.J., Ying, L., Sandberg, M., Russell, L.D. 1995. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *Anat. Rec.* 241: 181-204.
- Fujihara, N., Buckland, R.B. 1987. The effect of different freezing rates on fertilizing ability of frozen-thawed chicken spermatozoa. *Jpn J Anim Reprod.* 33: 11-14.
- Gee, G., Sexton, T.J. 1990. Cryogenic preservation of semen from the Aleutian Canada goose (*Branta Canadensis leucopareia*). *Zoo Biol.* 9: 361-371.
- Godinho, H.P., Cardoso, F.M. 1979. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. *Arq. Esc. Vet. UFMG.* 31: 351-361.
- Guerra, M.O. 1983. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Rev. Bras. Biol.* 43: 385-394.
- Harrisson, G.J., Ritchie, B.W., Harrisson, L.R. 1994. Avian medicine: principles and application. Florida: Wingers Publishing. 1384 p.
- Hartley, P.S., Dawson, B., Lindsay, C., McCormick, P., Wishart, G. 1999. Cryopreservation of houbara semen: a pilot study. *Zoo Biol.* 18: 147-152.
- Herrera, J.A., Quintana, J.A., López, M.A., Betancourt, M., Fierro, R. 2005. Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Arch Androl.* 51: 353-360.
- Hess, R.A., Cooke, P.S., Bunick, D., Kirby, J.D. 1993. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli cell and germ cell numbers. *Endocrinology.* 132: 2607-2613.
- Huckins, C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.* 4: 905-26.

- IBAMA. IBAMA dissolve comitê de recuperação da ararinha-azul. Disponível em: <[http://www.saudeanimal.com.br/noticia\\_ararinha.htm](http://www.saudeanimal.com.br/noticia_ararinha.htm)>. Acessado em 02 de novembro de 2004.
- IUCN – The World Conservation Union. 2009. Disponível em <<http://www.iucn.org>>. Acessado em 23 de outubro de 2009.
- Jones, R.C., Lin, M. 1993. Spermatogenesis in birds. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 15: 233-264.
- Kenagy, G.J., Trombulak, S.C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J. Mamm.* 67: 1-22.
- King, A.S., McLelland, J. 1984. Male reproductive system. In: King A.S., McLelland J, editors. *Birds: Their structure and function*. 2nd edition. Philadelphia: Baillie`re Tindal. pp. 166–174.
- Kirby, J.D., Froman, D.P. 2000. Reproduction in male. In: Whittow, G.C. *Sturkie’s avian physiology*. 5<sup>th</sup>. Hawaii: Elsevier. pp. 597-615.
- Leblond, C.P., Clermont, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55: 548-584.
- Lin, M., Jones, R. C., and Blackshaw, A. W. 1990. The cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and estimation of its duration. *J. Reprod. Fertil.* 88: 481–490.
- Lin, M., Jones, R.C. 1990. Spatial arrangement of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail. *Coturnix coturnix japonica*. *J. Reprod. Fertil.* 90: 361-367.
- Lin, M., Jones, R.C. 1992. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Cell Tissue Res.* 267: 591-601.
- Lofts, B., Murton, R.K. 1973. Reproduction in birds. In: Farner, D.S. & King, J.R. *Avian biology*. New York: Academic Press. v.3. pp 1-107.
- Lukaszewicz, E. 2002. An effective method for freezing white Italian gander semen. *Theriogenology*. 58: 19-27.

- Muñoz, E.M., Fogal, T., Dominguez, S., Scardapane, L., Guzman, J., Cavicchia, J.C., Piezzi, R.S. 1998. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). *Anat. Rec.* 252: 8-16.
- Noirault, J. Brillard, J.P., Bakst, M.R. 2005. Spermatogenesis in the turkey (*Meleagris gallopavo*): quantitative approach in immature and adult males subjected to various photoperiods. *Theriogenology*. 65:845–859.
- O'brien, J.K., Oehler, D.A., Malowski, S.P., Roth, T.L. 1999. Semen collection, characterization, and cryopreservation in a magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Zoo Biol.* 18: 199-214.
- Olmos, F. População de araras-azuis-de-lear aumenta 5%. Disponível em: <<http://208.185.149.227/WebX?50@53.pQEda7hNbl3.8@.2cba2783>>. Acessado em 01 de outubro de 2005.
- Ortavant, R., Courot, M., Hochereau-De-Reviere, M.T. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (eds). *Reproduction in domestic animals*. 3 ed. New York: Academic Press. pp. 203-227.
- Orth, J.M. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* 203: 485-492.
- Orth, J.M., Gunsalus, G.L., Lamperti, A.A. 1988. Evidentce from Setoli cell-depleted rats indicates that spematid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal developmente. *Endocrinology*. 122: 787-794.
- Paula, T.A.R. 1999. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: UFMG, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas.
- Pelletier, R.M. 1990. A novel perspective: the occluding zonule encircles the apex of the Sertoli cell as observed in birds. *Am. J. Anat.* 188: 87-108.
- Penfold, L.M., Harnal, V., Lynch, W., Bird, D., Derrickson, R., Wildt, D.E. 2001. Characterization of northern pintail (*Anas acuta*) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. *Reproduction*. 121: 267-275.
- Perey, B., Clermont, Y., Leblond, C.P. 1961. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* 108: 47-77.

- Periquitos australianos. 2009. <[www.periquitos.com.br](http://www.periquitos.com.br)>. Acessado em 10 de outubro de 2009.
- Pollock, C.G., Orosz, S.E. 2002. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology .Vet Clin Exot Anim 5: 441-474.
- Roosen-Runge, E.C. 1973. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. J. Reprod. Fertil. 35: 339-348.
- Roosen-Runge, E.C., Giesel, Jr.L.O. 1950. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. Am J. Anat. 87: 1-30.
- Russell, L. D., Chandrashekar, V., Bartke, A., Sinha-Hikim, A. P. 1994. The hamster Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. Int. J. Androl. 17: 93-106.
- Russell, L.D., Clermont, Y. 1977. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. Anat. Rec. 187: 347-366.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D. 1990a. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, Florida. 286p.
- Russell, L.D., Peterson, R.N. 1984. Determination of the alongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. J. Reprod. Fert. 70: 635-641.
- Samour, J.H. 2002. The reproductive biology of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*): semen preservation techniques and artificial insemination procedures. J Avian Med Surg. J Avian Med Surg. 16: 39-49.
- Shakkebak, N.E., Heller, C.G. 1973. Quantification of human seminiferous epithelium. J. Reprod. Fertil. 32: 379-389.
- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In. Knobil, E. & Neil, J.D. (eds) The physiology of reproduction, 2nd ed. Raven Press. N.Y. pp. 1363-1434.
- Short, R.V. 1997. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. Acta Paediatr. Suppl. 422: 3-7.
- Sick, H. 1997. Ornitologia Brasileira. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira. 912 p.

- Sinha-Hikim, A.P., Bartke, A., Russell, L.D. 1988. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. Biol. Reprod. 39: 1225-1237.
- Steinberger, A., Steinberger, E. 1971. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. Biol. Reprod. 4: 84-87.
- Tai, J.J., Chen, J.C., Wu, K.C., Wang, S.D., Tai, C. 2001. Criopreservation of gander semen. Br. Poult Sci. 42: 384-388.
- Tselutin, K., Seigneurin, F., Blesbois, E. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poult. Sci. 78: 586-590.
- Zahraddeen, D., Butswat, I.S.R., Kalla, D.J.U., Sir, S.M., Bukar, M.T. 2005. Effect of frequency of ejaculation on semen characteristics in two breeds of turkeys (*Meleagris gallopavo*) raised in a tropical environment. International Journal of Poultry Science 4: 217-221.

**CAPÍTULO I:** Criopreservação de sêmen de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805) em três meios com diferentes concentrações de glicerol e dois métodos de congelamento

## **RESUMO**

Foram utilizados 10 periquitos australianos machos (*Melopsittacus undulatus*), animais não ameaçados de extinção, como modelo para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida. Neste sentido, os objetivos do presente estudo foram coletar, avaliar, resfriar e criopreservar sêmen de periquito australiano. Além disso, foram testados 11 diferentes meios diluidores. As aves foram alocadas nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa. A coleta de sêmen foi realizada três vezes por semana via massagem digital na porção dorso caudal da cavidade celomática. O sêmen ejaculado foi coletado com tubos de micro hematócrito graduados não heparinizados. O volume de sêmen coletado foi diluído em solução de Ringer com lactato, e os espermatozóides foram classificados quanto à motilidade e vigor, sendo também calculados a concentração espermática e o percentual de anormalidades. Posteriormente as amostras foram rediluídas nos meios Lake<sup>®</sup>, TRIS-citrato-gema de ovo e TES-TRIS para teste de resfriamento a 5°C durante 48 horas. Para o teste de congelamento, amostras foram fracionadas em 2 alíquotas contendo 6 e 11% de glicerol. Uma amostra de cada tratamento foi submetida a dois processos de congelamento: uma curva rápida de resfriamento/congelamento e uma curva ultrarrápida de resfriamento/congelamento. Após o descongelamento foram considerados os mesmos parâmetros de análise para o sêmen a fresco, além do teste de termorresistência e dos testes hiposmótico, supravital e coloração por fluorescência para verificar a integridade de membrana. O meio Lake<sup>®</sup> apresentou melhores resultados para o resfriamento do sêmen após 24 horas. Não foram observados motilidade, vigor e integridade de membrana após o descongelamento das amostras nos diferentes protocolos.

**Palavras-chave:** criopreservação; sêmen; glicerol; periquito australiano; *Melopsittacus undulatus*

## 1 - INTRODUÇÃO

Os psitacídeos possuem características muito marcantes, como plumagem multicolorida, bico fortemente recurvado, quarto dedo deslocado caudalmente junto ao primeiro e alto grau de assimilação e reprodução de vocábulos humanos. Seus principais representantes são as araras, os papagaios e os periquitos. (Collar, 1997; Sick, 1997).

A destruição de seu habitat e o comércio ilegal para sua venda como animais de estimação ou de coleções fazem com que muitas espécies estejam ameaçadas de extinção. O caso mais grave é o da ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*), extinta na natureza e tendo no Brasil apenas oito indivíduos em cativeiro. Provavelmente, dentre todos os animais silvestres, os psitacídeos são os mais visados pelo tráfico de animais silvestres, que movimenta um comércio de milhões de dólares por ano (Birdlife, 2000).

O periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) possui grande adaptabilidade e reprodutibilidade em cativeiro, sendo classificado pela IUCN (2009) como *least concern*, ou seja, sem ameaça de extinção. Associam-se a essas características o fácil manejo em cativeiro, a resistência a doenças e os baixos custos com sua manutenção, o que o torna um excelente modelo experimental.

Técnicas de reprodução assistida envolvendo manipulação do sêmen podem ser diretamente aplicadas na resolução de problemas como incompatibilidade de pareamento, deficiências físicas, manejo genético e distanciamento entre indivíduos (Crosta et al., 2003). As técnicas para coleta e armazenamento de sêmen e inseminação artificial desenvolvidas em aves de produção, têm sido utilizadas como referência para as demais aves (Burrows e Quinn, 1937; Sexton, 1983).

A criopreservação de sêmen em nitrogênio líquido talvez seja a técnica mais trabalhada no âmbito da reprodução assistida, uma vez que pode garantir a utilização de gametas masculinos viáveis em situações, como a maximização de fêmeas inseminadas ou na impossibilidade da presença do macho. O seu sucesso está intimamente relacionado com o tipo de crioprotetor celular utilizado. O glicerol se destaca uma vez que apresenta o menor grau de toxicidade e maior efetividade em termos de manutenção da motilidade e vigor espermáticos após o descongelamento (Donoghue e Wishart, 2000).

Este trabalho teve como objetivo coletar, avaliar, resfriar e criopreservar sêmen de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*). Para tal foram testados 11 meios diluidores e duas metodologias de criopreservação. Os dados obtidos serão importantes

na elaboração de metodologias mais adequadas para conservação de sêmen de periquito australiano e futuramente de aves silvestres.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Animais**

Foram utilizados 10 periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) machos, adultos, com faixa etária entre 12 e 24 meses. O sexo foi determinado por meio de dimorfismo sexual externo, com os machos apresentando coloração azul escuro da cera, também conhecida como carúncula nasal, localizada caudodorsalmente à inserção da rinoteca, enquanto as fêmeas a apresentam com coloração rósea. Os animais, provenientes de criatório particular de Viçosa, foram mantidos em colônia de machos, em viveiros de arame com dimensões de 100 cm de comprimento, 50 cm de largura e 120 cm de altura, no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. A alimentação era composta por mistura de sementes de painço e alpiste, ração peletizada específica para periquitos australianos, além de frutas, verduras e legumes diversos. Água e comida foram oferecidas *ad libitum*.

O delineamento experimental foi submetido previamente à avaliação da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (protocolo número 58/2009), seguindo rigorosamente as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV. A coleta do material procedeu-se no intervalo de setembro de 2009 a janeiro de 2010, período de maior luminosidade ambiental e conseqüentemente de maior expressão reprodutiva desta espécie (Samour, 2002). A área onde se desenvolveu o presente estudo corresponde às coordenadas 20°45'S e 42°52'W. A iluminação local era dotada com sincronizador analógico para se garantir um fotoperíodo diário de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Para tal foi utilizada uma lâmpada incandescente de 60W, mantida acesa nos intervalos de 05 às 07 e de 17 às 19 horas. A temperatura ambiental apresentou uma variação entre 25 a 30°C.

## **2.2 - Coleta de sêmen**

Para a coleta de sêmen foi utilizada metodologia adaptada do trabalho de Burrows e Quinn (1935) com coleta de sêmen em galos domésticos. Os periquitos australianos foram submetidos inicialmente a um período de 15 dias de adaptação à contenção física e coleta do sêmen, apresentando ao final deste período comportamento relativamente tranqüilo, verificado por frequência respiratória normal e imediato interesse pela comida, após a soltura no viveiro. A manipulação das aves era realizada em horários rotineiros e com recompensa alimentar. Para tal as aves foram contidas fisicamente com uma toalha e colocadas em posição de estação, mimetizando a posição de cópula. A cabeça foi contida dentro de uma pequena máscara para evitar bicadas. A massagem para coleta de sêmen foi executada por meio de movimentos digitais suaves e ligeiros, com duração de 10 a 20 segundos em direção crânio caudal, do dorso do abdome até a cloaca, finalizando com uma suave compressão em ambos os lados da cloaca com os dedos polegar e indicador. O sêmen foi coletado por meio de tubos de micro hematócrito calibrados não heparinizados, após compressão cloacal com consequente eversão da parede interna e exposição das papilas dos ductos deferentes, sendo a capilaridade do tubo suficiente para a coleta do sêmen. Todas as avaliações seminais foram realizadas para cada indivíduo não havendo formação de *pool* de sêmen.

## **2.3 - Avaliação macroscópica**

A mensuração do volume de sêmen coletado foi efetuada a partir de graduação na parede externa dos próprios tubos de micro hematócrito, previamente calibrados por meio de pipetas automáticas, de 1 em 1 µl. A coloração e aspecto foram determinados visualmente. Amostras contaminadas com excretas ou sangue foram descartadas. A contaminação fecal foi reduzida uma vez que a coleta foi realizada sempre que possível antes da oferta de alimento nas primeiras horas da manhã. A contaminação com sangue foi reduzida com aplicação suave de compressão cloacal.

## **2.4 - Meios diluidores**

Foram testados 11 meios de diluição com o objetivo de selecionar aquele no qual o sêmen de periquito australiano demonstrasse melhor comportamento quanto à

motilidade, vigor e viabilidade sob resfriamento. Os meios avaliados foram soro fisiológico, pH 8,2, soro fisiológico com 1% glicose, pH 8,2, soro fisiológico com 5% glicose, pH 8,2, solução de Ringer com Lactato, pH 7,06, solução de Ringer com Lactato, pH 7,9, solução de Ringer com Lactato, pH 8,2, citrato de sódio, pH 8,2, Lake<sup>®</sup> (Lake, 1978), pH 8,2 (preparado com 10,0g de frutose, 0,68g de cloreto de magnésio, 1,28g de citrato de potássio tribásico, 8,51g de acetato de sódio e 19,20g de glutamato de sódio para 1 litro de água deslilada), TRIS-citrato-gema de ovo, pH 8,2 (preparado com 3,025g de TRIS (hidroximetil)-aminometano, 1,7g de ácido cítrico, 1,25g frutose, 20% de gema de ovo para 100ml de água destilada), PBS, pH 7,4 e PBS, pH 7,9.

## **2.5 - Avaliação microscópica**

As amostras de sêmen foram diluídas em solução de Ringer com Lactato, pH 8,2, em temperatura controlada de 25°C, na proporção de 1 parte de sêmen para 45 partes do diluidor. O fator de diluição foi proposto em função da alta concentração no ejaculado. Imediatamente uma gota de aproximadamente 5 µl do sêmen diluído foi depositada entre lâmina e lamínula de vidro a 25°C e analisada em microscópio de luz, em aumento de 100 e 400 vezes quanto à motilidade espermática progressiva (percentual de espermatozóides com movimento progressivo numa escala de 0 a 100%) e o vigor (força do movimento numa escala de 0 a 5).

Uma alíquota de 10 µl do sêmen diluído foi fixada em solução de formol salina tamponado, alcançando uma diluição final de 1:500. Esta diluição foi proposta, pois apresentou número significativo de espermatozóides para contagem, não sendo nem concentrada nem diluída demais, situações que aumentam a probabilidade de erro quando da estimativa final. A partir dessa diluição foi utilizado um volume, previamente homogeneizado, suficiente para preencher dois lados de uma câmara hematimétrica. A contagem dos espermatozóides foi realizada manualmente em microscópio de luz em aumento de 400x, em cinco quadrados grandes, compostos de 16 quadrados pequenos em ambos os lados da câmara. Foram consideradas apenas as cabeças, sendo que aquelas sobrepostas às laterais direita e inferior de cada quadrado maior foram desconsideradas. Caso houvesse diferença acima de 10% entre os valores encontrados nos dois lados da câmara era realizada nova preparação e nova contagem. A média dos valores encontrados entre os dois lados da câmara foi plotada na fórmula para cálculo da concentração em mililitros de sêmen, com a concentração final

calculada através da diluição. Outra alíquota de sêmen na mesma diluição foi analisada quanto à morfologia de cabeça, peça intermediária e cauda. Para isto, foi utilizado microscópio de luz de contraste de fase com aumento de 1000x, onde foram contadas 100 células para cada ejaculado. De posse das análises morfológicas foi calculado o percentual de anormalidades dos espermatozóides de cada ejaculado. Todas as análises e procedimentos para avaliação de sêmen citados anteriormente foram extrapolados das recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para animais domésticos (Henry e Neves 1998).

## **2.6 - Resfriamento**

O sêmen foi coletado segundo a metodologia descrita anteriormente. Foi diluído na proporção de 1 µl de sêmen para 20 µl de Ringer com lactato, pH 8,2 sendo em seguida dividido em quatro alíquotas iguais destinadas a uma nova rediluição na proporção de 1 µl do sêmen diluído para 10 µl de cada um dos quatro meios: Ringer com lactato, Lake<sup>®</sup>, TRIS-citrato-gema de ovo 20% e TES-TRIS-gema de ovo 20%. Uma avaliação inicial foi realizada para a verificação da motilidade e vigor em cada meio. Posteriormente os espermatozóides foram colocados em banho-maria a 5°C dentro de um refrigerador a 5°C (Ax e Lodge, 1975). Foram realizadas novas avaliações quanto à motilidade e vigor 24 e 48 horas após início do resfriamento.

## **2.7 - Congelamento**

O sêmen previamente diluído foi dividido em três alíquotas iguais, às quais foram acrescentados os meios Lake<sup>®</sup>, TRIS-citrato-gema de ovo 20% e TES-TRIS-gema de ovo 20% na proporção de 2 partes destes meios para 1 parte do sêmen diluído. Posteriormente, cada alíquota foi redividida em partes iguais onde foram acrescentados os mesmos meios, a temperatura de 25°C, na proporção de 1:1, porém contendo 24 e 12% de glicerol alcançando uma concentração final de 12 e 6% de glicerol, respectivamente. Somente foram congelados ejaculados com volume igual ou superior a 2 µl de sêmen.

O sêmen foi envasado em fragmentos de palhetas comerciais de 0,25 mm de diâmetro interno com aproximadamente 3,5 cm de comprimento. Estes fragmentos de palhetas foram preenchidos com cerca de 20 µl de sêmen por meio de acoplagem em ponteira e pipeta com volume ajustável. As extremidades foram vedadas com massa de

modelar de cores diferentes para facilitar a identificação das concentrações de glicerol. Para o armazenamento em nitrogênio líquido os fragmentos de palhetas contendo sêmen de cada procedimento foram acondicionados dentro de tubetes tipo ependorfs de 2,0 ml perfurados e identificados conforme o meio e a taxa de congelamento.

Foram utilizados dois métodos de resfriamento/congelamento, ditos rápido e ultrarrápido, como descrito abaixo.

Método rápido: após o envase, as palhetas foram acondicionadas em tubetes perfurados, assim como previamente descrito, acoplados a armação de arame e mergulhados em água a 5°C, dentro da geladeira, onde permaneceram por 10 minutos em uma taxa de resfriamento de 8,0°C/min, a partir de 25°C até 5°C (Samour, 2002). Em seguida os ependorfs foram dispostos em um suporte à 3 cm da superfície de nitrogênio líquido, em uma caixa térmica, e conseqüentemente congelados no vapor de nitrogênio líquido em uma taxa de 6,5°C/min a -70,0°C/min durante 10 minutos. Após o congelamento foram rapidamente imersos diretamente em nitrogênio líquido, na própria caixa térmica, sendo os tubetes posteriormente acondicionados em racks armazenados em botijão de nitrogênio líquido.

Método ultrarrápido: não foi utilizado qualquer tipo de resfriamento prévio, sendo utilizada uma caixa térmica com uma coluna de nitrogênio líquido de cerca de 5 cm. Os tubetes perfurados contendo as palhetas foram dispostos em um suporte a 3 cm da coluna de nitrogênio líquido e congelados no vapor de nitrogênio líquido em uma taxa de 9,5°C/min a -70,0°C/min durante 10 minutos e então rapidamente imersos em nitrogênio líquido. Posteriormente foram acoplados em rack e armazenados em botijão de nitrogênio líquido.

Assim, para cada meio foram preparados dois tubetes, correspondentes aos métodos rápido e ultrarrápido de congelamento, contendo 3 palhetas de um meio com 12% de glicerol e 3 palhetas do mesmo meio com 6% de glicerol. Cada palheta destinou-se a um teste de pós-descongelamento, sendo estes: teste de termorresistência, coloração supravital com eosina-negrosina e teste hiposmótico conforme Tabela 1.

Tabela 1: Delineamento do congelamento

Congelamento	Meio	Concentração de glicerol
Ultrarrápido	Lake	6%
Rápido	Lake	12%
Ultrarrápido	TRIS-citrato gema de ovo	6%
Rápido	TRIS-citrato gema de ovo	12%
Ultrarrápido	TES-TRIS gema de ovo	6%
Rápido	TES-TRIS gema de ovo	12%

## 2.8 - Descongelamento

As palhetas foram retiradas dos tubetes e imersas em água a 25°C durante 30 segundos, sendo o conteúdo de cada uma destinado a um teste de pós-descongelamento. O conteúdo era vertido em um endorf de 500µl. A longevidade espermática foi estimada por meio do teste de termorresistência (TTR). Para isso, uma alíquota de três µl de sêmen descongelado era disposta entre lâmina e lamínula a 25°C e avaliada em microscópio de luz em aumento de 100 e 400 vezes quanto à motilidade e vigor a cada 10 minutos.

A integridade de membrana espermática foi avaliada por meio do teste de coloração supravital. Para tal, uma alíquota de três µl de sêmen descongelado foi misturada com o mesmo volume de eosina-negrosina e avaliada rapidamente em microscópio de luz em aumento de 1000 vezes. Foram contabilizadas 200 células entre coradas, correspondentes às células com lesão de membrana plasmática, e não coradas consideradas como células viáveis.

Outro teste de integridade de membrana plasmática realizado foi o hiposmótico. Para tal misturou-se água destilada com sêmen descongelado na proporção de 1:1 sendo posteriormente incubado em banho-maria, durante 15 minutos, em temperatura de 25°C (Christensen, 1995). Posteriormente, uma alíquota de 5 µl foi avaliada em aumento de 1000 vezes em microscópio de contraste de fase. Foram

contabilizadas 100 células entre aquelas com cauda dobrada, consideradas como de membrana íntegra e aquelas com cauda reta, considerados como de membrana lesada. Para o cálculo final foi subtraída a porcentagem de espermatozóides com cauda dobrada encontrados no morfológico do sêmen fresco.

Também foi realizado o teste de integridade de membrana por fluorescência colocando-se 10 $\mu$ L de sêmen descongelado e 20 $\mu$ L de solução contendo iodeto de propídio (PI) e carboxifluoresceína (CFDA), em um tubete envolvido com papel alumínio para evitar contato com a luz. As amostras foram incubadas a 25°C por 15 minutos. Uma gota foi depositada entre lâmina e lamínula e analisada em microscópio de fluorescência em aumento de 1000X com auxílio de óleo de imersão. Foram consideradas como possuindo membrana íntegra aquelas que se coraram de verde e com membrana danificada as que se coraram em vermelho (Seigneurin e Blesbois, 1995). As amostras foram avaliadas em até uma hora após o período de incubação.

## **2.9 - Análise estatística**

Volume de sêmen, concentração espermática e frequência de patologias espermáticas foram analisados quanto à média e desvio padrão. Foram realizados análise de variância e teste de média de agrupamento Skott-Knott, em nível de 1% de probabilidade, segundo programa estatístico sistema de análises estatísticas e genéticas SAEG-9.1 (UFV, 2007), para avaliação da resposta dos espermatozóides aos diferentes meios de diluição. Os dados de vigor e motilidade dos espermatozóides em função dos tempos de resfriamento foram avaliados segundo intervalo de confiança a 95% utilizando como ferramenta auxiliar o programa *Microsoft Office Excel® 2007*.

## **3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 - Coleta e avaliação macroscópica de sêmen**

A metodologia de coleta do sêmen, adaptada a partir de Burrows e Quinn (1935), com 15 segundos de massagem dorsal seguida por uma suave compressão nas laterais da cloaca, foi suficiente na maioria dos procedimentos para a eversão da cloaca e ejaculação. O acesso ao sêmen de periquitos australianos é facilitado pela presença de estruturas armazenadoras terminais na cloaca, denominadas em conjunto de *Seminal*

*Glomera*. Estas se apresentam como duas estruturas ovóides, uma para cada antímero do urodeu, formada por tortuosas convoluções da porção final dos ductos deferentes, representando o principal sítio de armazenamento de sêmen nessa espécie e em passeriformes (King e McLelland, 1984; Samour, 2002).

Foram realizadas 137 tentativas de coleta de sêmen em 10 aves com 73% de sucesso. A aparência do sêmen variou entre aquosa e cremosa, de coloração amarelada a branca, sendo que 90% dos ejaculados apresentaram aspecto branco e cremoso, presumidamente em consequência da alta concentração de espermatozóides observada em todos os casos. Stelzer et al. (2005) trabalharam com metodologia semelhante para a coleta de sêmen em sete espécies de psitacídeos cujos ejaculados variaram entre transparente, leitoso transparente, marfim transparente e leitoso, sendo estes últimos os que apresentaram maior concentração espermática. Cerca de 10% dos ejaculados obtidos no presente estudo estavam visualmente contaminados com sangue, fezes, urina ou uratos, sendo avaliados à parte. Contaminação com sangue está diretamente relacionada à compressão excessiva exercida sobre as laterais da cloaca durante a parte final da coleta. A frequência de contaminação foi reduzida ao longo do desenvolvimento do projeto. Assim como observado por Samour (1986), ao trabalhar com a mesma espécie, o maior índice de sucesso nas coletas de sêmen foi durante o período da manhã, antes dos animais serem alimentados, sendo também menor o índice de contaminações observado neste período.

O volume de sêmen coletado das aves do presente experimento variou de 0,5 a 10  $\mu\text{l}$  ( $3,95 \pm 2,5 \mu\text{l}$ ), valores inferiores aos observados por Samour (2002), também em periquitos australianos em amostragem superior ( $5,7 \pm 8,12 \mu\text{l}$ ). O volume médio do sêmen obtido em periquito australiano foi superior ao verificado por Anderson et al. (2002) e Stelzer et al. (2005) em psitacídeos de porte maior. Os órgãos genitais masculinos dos periquitos australianos, assim como das demais espécies aviárias, são desprovidos de glândulas anexas o que confere um pequeno volume ao sêmen (Evans, 1996), sendo o pouco líquido seminal produzido por células epiteliais e de sustentação do epidídimo e dos ductos deferentes (King e McLelland, 1984).

### 3.2 - Diluição e avaliação microscópica do sêmen

Em periquitos australianos obtiveram-se poucos  $\mu$ ls de ejaculado, porém extremamente concentrado, alcançando o valor médio de  $12,58 \times 10^9 \pm 5,15$  sptz/ml superior à média de  $10,4 \times 10^9 \pm 16,28$  sptz/ml encontrada por Samour (2002) em periquitos dessa mesma espécie. Desta forma é necessário a utilização de meios diluidores em altas proporções, que mantenham a viabilidade espermática, no intuito de prover volume suficiente para avaliação seminal e maximização do sucesso na inseminação das fêmeas. Os diluidores são em geral soluções salinas tamponadas (Donoghue e Wishart, 2000).

Neste trabalho foi pesquisado um rol de meios diluidores, dentre os indicados pela literatura direcionada para sêmen de aves, além de soluções mais simples, que não interferissem com a motilidade e o vigor dos espermatozóides. Na Tabela 2 encontram-se todos os meios diluidores testados com respectivo comportamento dos espermatozóides em termos de motilidade e vigor espermáticos.

Tabela 2. Motilidade (%) e vigor espermáticos do sêmen de periquitos australianos *Melopsittacus undulatus* em diferentes meios de diluição imediatamente após a diluição.

Meios de diluição	Motilidade <sup>1</sup>	Vigor <sup>1</sup>
Ringer Lactato pH 8,2	92,33 $\pm$ 24,41A	4,09 $\pm$ 1,18A
Ringer Lactato pH 7,9	86,67 $\pm$ 14,43A	4,00 $\pm$ 0,00A
Ringer Lactato pH 7,06	75,64 $\pm$ 25,52A	3,67 $\pm$ 1,22A
Tris-Citrato pH 8,2	62,17 $\pm$ 42,77A	3,00 $\pm$ 1,42A
Lake <sup>®</sup> pH 8,2	28,88 $\pm$ 26,93B	1,00 $\pm$ 0,57B
Citrato pH 8,2	20,00 $\pm$ 21,21B	1,50 $\pm$ 0,71B
PBS pH 7,4	5,00 $\pm$ 7,07B	0,00 $\pm$ 0,00B
PBS pH 7,9	0,50 $\pm$ 0,71B	0,00 $\pm$ 0,00B
Soro Fisiológico pH 8,2	15,33 $\pm$ 18,09B	0,88 $\pm$ 0,63B
Soro Fisiológico (+Glicose 1%) pH 8,2	2,93 $\pm$ 3,33B	0,20 $\pm$ 0,46B
Soro Fisiológico (+Glicose 5%) pH 8,2	0,00 $\pm$ 0,00B	0,00 $\pm$ 0,00B

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a  $p < 0,01$

Foram verificadas diferenças significativas na motilidade e no vigor dos espermatozoides dos periquitos australianos (*M. undulatus*) entre os diferentes meios de diluição utilizados. Os meios Ringer com Lactato nos diferentes valores de pH e o meio TRIS-citrato-gema de ovo proporcionaram maiores valores de motilidade e vigor dos espermatozoides destas aves (Tabela 2). Samour (2002) utilizou os meios BWW<sup>®</sup> (Biggers et al., 1971) pH 8,3 com 20 mg/ml de albumina de soro bovino e Lake<sup>®</sup> (Lake e Ravie, 1984) a 37°C obtendo 92 e 89% de motilidade, respectivamente. Stelzer et al. (2005) diluíram sêmen de jandaia de testa vermelha (*Aratinga auricapilla*) e *blue naped parrot* (*Tanygnathus lucionensis*) alcançando médias de 46,7 e 85,0% de motilidade, respectivamente. Brock (1991) obteve motilidade entre 41 e 82% diluindo sêmen de *hispaniolan parrots* (*Amazona ventralis*) sem explicitar a temperatura do meio utilizado.

Apesar da semelhança estatística entre os meios Ringer com Lactato em diferentes níveis de pH e o meio Tris-citrato, o meio Ringer com Lactato, pH 8,2, foi escolhido como o diluidor padrão no presente trabalho por apresentar numericamente melhor resposta em termos de motilidade e vigor. O pH de 8,2 foi registrado por Samour (2002) que pesquisou o líquido seminal centrifugado de pool de sêmen de periquitos australianos. O pH é uma das características dos meios diluidores que mais influencia na integridade espermática, uma vez que, o pH de um diluente pode afetar a taxa metabólica e conseqüentemente a motilidade dos espermatozoides. Agentes tamponantes formados por ácidos e seus conjugados básicos são extremamente importantes para evitar a flutuação do pH que tende a diminuir com o tempo de estocagem, por causa da produção e acúmulo de ácido láctico pelos espermatozoides (Christensen, 1995). Espermatozoides de galo e peru suportam variação de pH entre 6 e 8 (Bogdonoff e Schaffner, 1954; Van Wambeke, 1967). O pH baixo reduz a taxa metabólica e conseqüentemente a motilidade e captação de oxigênio em espermatozoides de galo, enquanto o pH alto aumenta a taxa metabólica e conseqüentemente a motilidade *in vitro* (Bogdonoff e Schaffner, 1954). Lake e Ravie (1979) observaram sobrevida maior dos espermatozoides de galo em diluentes com pH 6,8 e 7,1 em relação aos diluentes com pH 5,8 e 7,4. Uma vez que os diluentes para sêmen de aves domésticas são comumente formulados com pH ao redor de 7 e utilizados também em espécies não domésticas, sem informações espécie específicas, nem sempre obtêm-se resultados consideráveis. Assim como no presente experimento, Samour (2002) obteve melhor motilidade no sêmen de periquitos australianos, ao

utilizar meio diluidor com pH mais alto (8,3) do que aqueles padronizados para a utilização em sêmen de galo.

Associado ao pH, o meio diluidor apresenta ainda como importantes variáveis metabólicas a osmolaridade e a fonte de energia, sendo ambos de grande importância na integridade dos espermatozoides *in vitro* (Donoghue e Wishart, 2000). Espermatozoides de aves domésticas podem manter a habilidade fertilizante em diluentes com osmolaridades variando de 250 a 460 mOs/kg H<sub>2</sub>O (Donoghue e Wishart, 2000). A movimentação da água do meio para o interior da célula espermática e vice e versa, determinado pela concentração osmótica, é a base física para alterações metabólicas na célula e também para testes de integridade de membrana comumente utilizados (Clark et al., 1984). A osmolaridade do sêmen de periquito australiano foi definida por Samour (2002) como 329,9 mOs/kg. No presente experimento utilizou-se meios variando de 271,5 (Ringer com Lactato) a 404,0 mOs/kg (TRIS–citrato) sendo observada pequena influência isolada da osmolaridade no meio quanto ao vigor e motilidade espermática.

O desenvolvimento de meios diluidores para o sêmen de aves deve considerar as diferenças fisiológicas e metabólicas requeridas pelos espermatozoides das diferentes espécies (Donoghue e Wishart, 2000). O sêmen de galo é metabolicamente competente em condições aeróbicas e anaeróbicas enquanto o espermatozóide de peru requer altos níveis de oxigênio para sua sobrevivência (Wishart, 1981). A composição do plasma seminal de periquitos australianos apresenta quantidades relativamente altas de glicose e baixas de frutose em sua composição (Samour, 2002). Este autor, utilizando meios contendo frutose, obteve resultados expressivos na manipulação do sêmen a fresco. No presente experimento foram utilizados meios diluidores com diferentes fontes de energia, como frutose, glicose, citrato e lactato, sendo observados maiores índices de motilidade e vigor nos meios contendo lactato e citrato. Ax e Lodge (1975) relatam, em experimento com vários meios diluidores, que sêmen de galo mantido *in vitro* em temperatura ambiente, apresentou maiores percentuais de motilidade em meio contendo lactato.

Diferente do observado no sêmen de mamíferos o espermatozóide das aves é muito mais tolerante as variações de temperatura. Desta forma, é factível a manutenção de sêmen fresco de aves em temperatura ambiente por períodos relativamente longos de tempo. *In vivo* os espermatozoides de todas as aves estudadas são armazenados no oviduto feminino por períodos que variam de alguns dias a muitas semanas (Birkhead e Moller, 1992). A estocagem dos espermatozoides se dá em pequenos túbulos

denominados “túbulos de estocagem” ou glândulas hospedeiras, normalmente dispostos na transição uterovaginal onde os espermatozóides são mantidos imóveis até sua utilização (Bakst et al., 1994). Os espermatozóides armazenados são liberados através de estímulo neuronal do oviduto, induzido pela passagem do ovo durante a postura (Pollock e Orosz, 2002). A regulação da motilidade dos espermatozóides foi primeiramente relacionada à temperatura corporal. Munro (1938) descreveu a imobilidade dos espermatozóides de galos mantidos em solução tampão em temperatura corporal (40 a 41° C). Também em periquitos australianos do presente experimento observou-se rápida queda de motilidade com utilização de meios em temperaturas próxima ao fisiológico. Porém, Samour (2002), manipulando sêmen desses animais, utilizou temperatura de 37° C, descrevendo resultados satisfatórios na manutenção da motilidade.

Espermatozóides de galo mantidos a 40° C *in vitro* recuperam movimentação quando expostos aos fluidos dos órgãos reprodutores masculinos e femininos. Isto está relacionado ao fato do cálcio intracelular ser essencial para a estimulação da motilidade espermática e pelos fluidos, especialmente aqueles provenientes da câmara calcígena, conterem níveis suficientes de cálcio (Ashizawa e Wishart, 1992). Van de Laan (2007) utilizou temperatura ambiente na manipulação do sêmen de galos e meios experimentais. No presente estudo padronizou-se a temperatura de 25° C na manipulação do sêmen de periquitos australianos, uma vez que a queda de motilidade foi atenuada se comparada à temperaturas mais altas.

### **3.3 - Análise morfológica do sêmen**

Na Figura 1-A e Tabela 3 estão apresentados os dados relativos à análise morfológica do sêmen de periquitos australianos. As patologias observadas foram também agrupadas em defeitos maiores e menores quanto a sua capacidade de fecundação (Figura 1-B). A principal patologia verificada na cabeça dos espermatozóides foi contorno anormal e na peça intermediária e cauda foram observados dobramentos como principais patologias. Nos psitacídeos *Tanygnathus lucionensis* e *Aratinga auricapilla* observou-se como principal patologia de cabeça o subdesenvolvimento sendo o dobramento também predominante na peça intermediária (Stelzer et al., 2005).

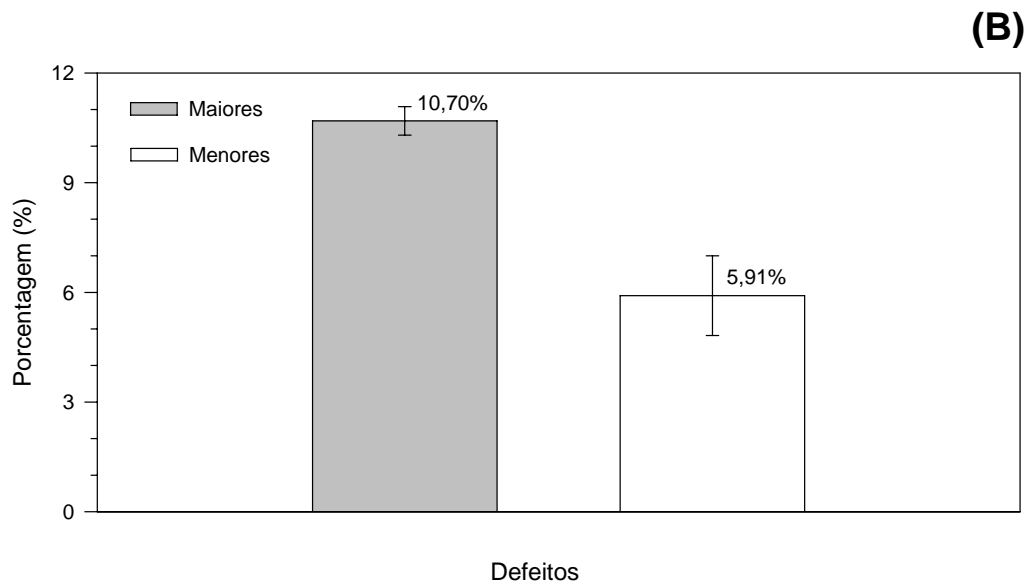
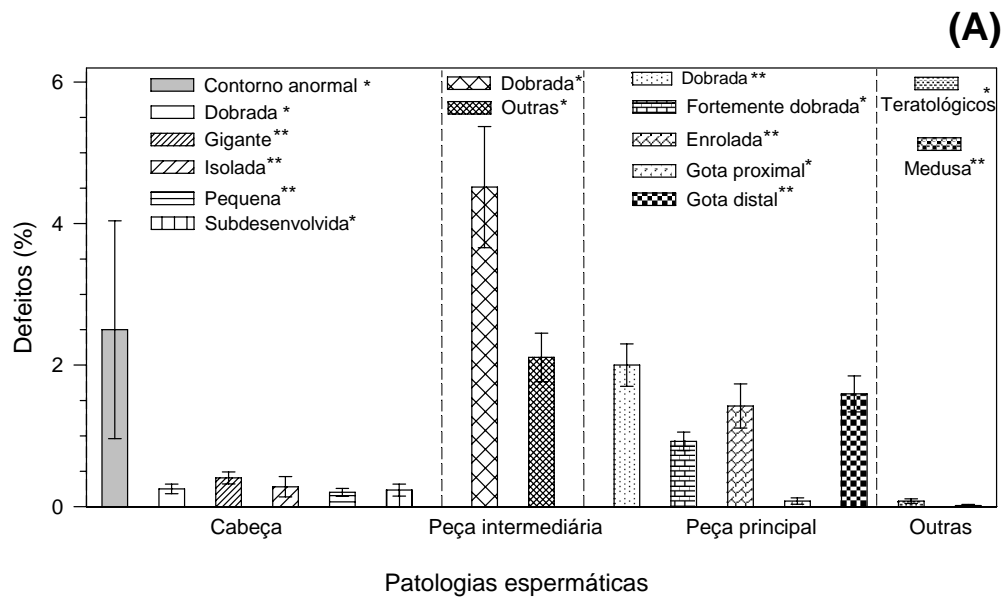


Figura 1: (A) Defeitos espermáticos verificados na cabeça, peça intermediária e cauda de espermatozóides de periquito australiano. (B) Defeitos maiores e menores verificados em espermatozóides de periquitos australianos. \*Defeitos espermáticos maiores; \*\* Defeitos espermáticos menores.

Tabela 3. Percentagem média  $\pm$  erro padrão de características patológicas observadas em espermatozoides de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*).

	Características	Média $\pm$ desvio padrão
Cabeça	Contorno anormal <sup>1</sup>	2,5 $\pm$ 8,7
	Dobrada <sup>1</sup>	0,3 $\pm$ 0,4
	Gigante <sup>1</sup>	0,4 $\pm$ 0,5
	Isolada <sup>1</sup>	0,3 $\pm$ 0,8
	Pequena <sup>1</sup>	0,2 $\pm$ 0,3
	Subdesenvolvida <sup>1</sup>	0,2 $\pm$ 0,5
Peça intermediária	Dobrada <sup>2</sup>	4,5 $\pm$ 4,8
	Outras <sup>2</sup>	2,1 $\pm$ 1,9
Peça principal	Dobrada <sup>3</sup>	2,0 $\pm$ 1,7
	Fortemente dobrada <sup>3</sup>	0,9 $\pm$ 0,7
	Enrolada <sup>3</sup>	1,4 $\pm$ 1,8
	Gota proximal <sup>3</sup>	0,1 $\pm$ 0,3
	Gota distal <sup>3</sup>	1,6 $\pm$ 1,4
Outros elementos	Teratológicos <sup>4</sup>	0,1 $\pm$ 0,2
	Medusa <sup>4</sup>	0,03 $\pm$ 0,1

<sup>1</sup>Patologia de cabeça; <sup>2</sup>Peça intermediária; <sup>3</sup>Peça principal; <sup>4</sup>Outros elementos

### 3.4 - Resfriamento do sêmen

O uso de sêmen resfriado de galos tem sido incrementado na produção comercial para melhor aproveitamento de machos de genética superior (Van de Laan, 2007). O uso de meios tamponados com osmolaridade equilibrada e baixas temperaturas (2 a 5°C) aumentam a viabilidade do sêmen em períodos superiores a 24 horas (Seigneurin e Blesbois, 1995). No presente experimento foram testados quatro meios diluidores em temperatura de 5 °C, cujos resultados se encontram na tabela 4. Houve diferenças significativas da motilidade de espermatozoides de periquito australiano entre os meios de diluição e tempos de avaliação.

A comparação entre a efetividade do resfriamento de sêmen em aves com dados de literatura é dificultada pela diversidade de meios utilizados, variedade de espécies pesquisadas e diferenças metodológicas. Os valores mais altos de motilidade no tempo 0 ocorreram no sêmen diluído em Ringer com lactato, pH8,2, porém, a partir de 24 horas, o meio Lake<sup>®</sup> apresentou melhores resultados (Tabela 4).

Tabela 4. Médias e desvio padrão de vigor e motilidade espermáticos de periquito australiano em quatro diferentes meios de diluição ao longo de três tempos de avaliação.

Tempo (horas)	Meios de diluição <sup>1</sup>			
	Ringer lactato	Lake	Tris-citrato	Tes-tris
Vigor (IC <sub>95%</sub> )				
0	3,83 ± 1,17aA	1,75 ± 1,28bA	1,50 ± 0,58cA	0,42 ± 0,58dA
24	1,17 ± 1,08aB	1,75 ± 0,99bA	0,50 ± 0,71dB	0,75 ± 0,42cB
48	0,92 ± 0,20aC	1,25 ± 0,63aB	0,25 ± 0,50cC	0,75 ± 0,61bB
Motilidade (IC <sub>95%</sub> )				
0	81,50 ± 22,06aA	33,80 ± 40,38cA	43,33 ± 23,21bA	2,00 ± 3,95dB
24	21,00 ± 17,10bB	29,67 ± 31,42aB	4,83 ± 4,36dB	17,30 ± 17,53cA
48	11,33 ± 7,92bC	21,83 ± 18,88aC	2,20 ± 4,38dC	5,50 ± 4,64cC

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha (comparação dos meios de diluição em cada tempo), e maiúscula na coluna (comparação dos tempos de avaliação em cada meio de diluição) não diferem entre si pelo intervalo de confiança a 95%.

### 3.5 - Congelamento de sêmen

O congelamento de sêmen de mamíferos, em especial aqueles domésticos tem sido a técnica criobiológica mais difundida e comercialmente explorada atualmente. Porém, a despeito do grande sucesso alcançado nestes animais, em aves domésticas poucos progressos foram registrados nas últimas décadas (Donoghue e Wishart, 2000). O baixo índice de sucesso em parte resulta da maior sensibilidade do espermatozóide de aves aos processos de congelamento e descongelamento (Hammerstedt e Graham, 1992). Adicionalmente, existe ainda grande importância relativa ao sistema de transporte e estocagem nos órgãos genitais femininos, uma vez que somando-se à perda natural da integridade ao descongelamento, ao atingir os túbulos de estocagem na junção uterovaginal os espermatozoides são armazenados por dias antes da fertilização (Long, 2006).

O uso de diferentes crioprotetores na preservação do sêmen de aves é um dos principais focos de pesquisa uma vez que, todas as substâncias testadas apresentam

algum grau de inconsistência quanto à integridade pós-descongelamento. Segundo Donoghue e Wishart (2000), o crioprotetor mais tóxico e menos efetivo é o Dimetilsulfóxido (DMSO) seguido pelo Etilenoglicol (EG) que por sua vez é menos efetivo que a Dimetilacetamida (DMA). O menos tóxico e mais efetivo crioprotetor é o glicerol, porém, ironicamente, apresenta efeito contraceptivo ao espermatozóide inseminado intravaginalmente. No presente estudo optou-se pelo uso do glicerol sendo testadas duas diferentes concentrações na composição dos diferentes meios (Tabela 1). Após o descongelamento nenhum dos meios foi eficiente na preservação da motilidade e do vigor dos espermatozóides (Tabela 5 e 6).

Tabela 5: Motilidade (Mot) e vigor espermáticos ao longo do teste termorresistência a 25°C, em três meios diferentes com duas concentrações de glicerol após e congelado no método rápido.

Ave	Meio	Glicerol	TTR (min)					
			0		10		20	
			Mot	Vigor	Mot	Vigor	Mot	Vigor
Ave 1 08/01/10	LAKE®	6%	0,5	0,5	0	0	0	0
		12%	<0,5	<0,5	0	0	0	0
	TRIS	6%	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0	0
		12%	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0	0
	TES-TRIS	6%	0	0	0	0	0	0
		12%	0	0	0	0	0	0
Ave 2 02/01/10	LAKE®	6%	5	<0,5	10	1	0	0
		12%	5	1	5	1,5	3	1,5
	TRIS	6%	<0,5	<0,5	0	0	0	0
		12%	<0,5	1	0	0	0	0
	TES-TRIS	6%	0	0	0	0	0	0
		12%	<0,5	<0,5	0	0	0	0
Ave 3 08/01/10	LAKE®	6%	0,5	0,5	0	0	0	0
		12%	<0,5	<0,5	0	0	0	0
	TRIS	6%	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0	0
		12%	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0	0
	TES-TRIS	6%	0	0	0	0	0	0
		12%	0	0	0	0	0	0
Ave 3 29/12/09	LAKE®	6%	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,5	0,5
		12%	0	0	5	1,5	0,5	0,5
	TRIS	6%	<0,5	<0,5	0	0	0	0
		12%	0	0	<0,5	<0,5	0	0
	TES-TRIS	6%	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
		12%	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

Tabela 6: Motilidade (Mot) e vigor espermáticos ao longo do teste termorresistência a 25°C, em três meios diferentes com duas concentrações de glicerol e congelado no método ultrarrápido.

Ave	Meio	Glicerol	TTR (min)					
			0		10		20	
			Mot	Vigor	Mot	Vigor	Mot	Vigor
Ave 1 08/01/10	LAKE	6%	<0,5	<0,5	0	0	<0,5	0,5
		12%	<0,5	<0,5	0	0	<0,5	0,5
	TRIS	6%	0	0	0	0	0	0
		12%	0	0	0	0	0	0
	TES-TRIS	6%	0	0	0	0	0	0
		12%	0	0	0	0	0	0
Ave 2 02/01/10	LAKE	6%	<0,5	<0,5	<0,5	2	1	1,5
		12%	0	0	<0,5	2	10	2
	TRIS	6%	<0,5	<0,5	1	0,5	0	0
		12%	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0	0
	TES-TRIS	6%	0	0	0	0	0	0
		12%	0	0	0	0	0	0
Ave 3 08/01/10	LAKE	6%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		12%	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,5	1
	TRIS	6%	<0,5	<0,5	0	0	0	0
		12%	<0,5	<0,5	0	0	0	0
	TES-TRIS	6%	0	0	0	0	0	0
		12%	0	0	0	0	0	0
Ave 3 29/12/09	LAKE	6%	8	2	5	1,5	0,5	3
		12%	0,5	0,5	5	1,5	1	3
	TRIS	6%	<0,5	<0,5	0	0	0	0
		12%	0	0	0	0	0	0
	TES-TRIS	6%	0	0	0	0	0	0
		12%	0	0	0	0	0	0

Para o congelamento do sêmen de diferentes espécies animais são necessários diferentes curvas de resfriamento e tempo de equilíbrio para atingir a temperatura de armazenamento. No congelamento do sêmen de aves um resfriamento inicial até 5° C é requerido, sendo os espermatozóides extremamente resistentes a esta etapa, diferente do sêmen mamífero (Donoghue e Wishart, 2000). Em uma segunda etapa, após um tempo de equilíbrio, a temperatura da amostra atinge aproximadamente -70°C. A formação de cristais de gelo no espermatozóide é um dos fatores mais limitantes no processo de descongelamento celular, podendo lesar a membrana e inviabilizar a função celular. Teoricamente o espermatozóide de galo parece não ser afetado por altas curvas de

congelamento (Ravie e Lake, 1982). Velocidades de congelamento de 5 a 10°C/min são mais efetivas que taxas inferiores (Donoghue e Wishart, 2000). Em uma terceira etapa a amostra de sêmen é diretamente imersa e armazenada a -196°C.

No presente estudo foram definidos dois tipos de taxas de resfriamento/congelamento, os métodos rápido e ultrarrápido, não sendo observada motilidade satisfatória após o descongelamento em ambos os métodos. Samour (2002), utilizando método de resfriamento/congelamento rápido em dois diferentes meios para congelamento do sêmen de periquitos australianos, obteve taxas consideráveis de sobrevivência após o descongelamento.

A velocidade de descongelamento do sêmen também pode definir a viabilidade do espermatozóide pós-descongelamento uma vez que pode favorecer a permanência de cristais de gelo no interior celular (Ravie e Lake, 1982). Van der Laan (2007), ao testar o descongelamento de sêmen de galos em temperaturas de 5°, 40° e 60°C, conclui que os melhores resultados são observados a 40°C. Samour (2002) obteve resultados consideráveis com temperaturas a 5° e 37°C.

Foram definidos três testes de viabilidade espermática após o descongelamento do sêmen, sendo que o teste de coloração por fluorescência, embora apresentasse bons resultados com o sêmen a fresco (Figura 2), não possibilitou a visualização de coloração nos espermatozóides descongelados.



Figura 2: Fotomicrografia de espermatozóide de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) em microscópio de fluorescência. Espermatozóide com lesão de membrana apresenta-se corado de vermelho. Espermatozóide com membrana intacta apresenta-se corado de verde (seta). 1000X.

O teste hiposmótico baseia-se na penetração de água no interior do espermatozóide em meio hiposmótico. Quando este apresenta integridade de membrana há um dobramento da cauda (Figura 3) devido ao excesso de líquido no seu interior. No presente experimento, em todas as amostras testadas após o descongelamento, foi observado pequeno percentual de dobramento nos espermatozóides o que indica grande índice de lesões de membrana espermática (Tabela 7).



Figura 3: Espermatozóide de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) com dobramento de cauda em meio hiposmótico. 1350X.

Tabela 7- Percentuais de espermatozóides de periquitos australianos com cauda dobrada, em meio hiposmótico pós-descongelamento, em diferentes meios em duas concentrações de glicerol, congelados em método rápido e ultrarrápido.

Ave	Meio	Glicerol	CAUDA DOBRADA	
			Rápido	Ultrarrápido
Ave 1 08/01/10	LAKE	6%	16	14
		12%	16	14
	TRIS	6%	6	4
		12%	21	2
		6%	*	*
TES-TRIS	6%	*	*	
	12%	*	*	
Ave 2 02/01/10	LAKE	6%	50	21
		12%	70	32
	TRIS	6%	18	23
		12%	11	14
		6%	*	*
TES-TRIS	6%	*	*	
	12%	*	*	
Ave 3 08/01/10	LAKE	6%	18	11
		12%	21	9
	TRIS	6%	16	6
		12%	24	11
		6%	*	*
TES-TRIS	6%	*	*	
	12%	*	*	
Ave 3 29/12/09	LAKE	6%	1	16
		12%	8	25
	TRIS	6%	15	8
		12%	3	3
		6%	*	*
TES-TRIS	6%	*	*	
	12%	*	*	

\* não foi possível contabilizar.

O teste de coloração supravital baseia-se na habilidade do espermatozóide viável de manter na sua face externa o corante adicionado ao meio, sendo aqueles corados considerados inviáveis. No presente experimento foi observado em todas as amostras testadas, após o descongelamento, um alto índice de células coradas (Figura 4) (Tabela 8), denotando um grande percentual de células inviáveis.



Figura 4: Espermatozóides de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) corados pelo corante eosina-negrosina no teste de coloração supravital. 1000X.

Tabela 8 - Espermatozóides de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) não corados com eosina-negrosina, pós descongelamento em diferentes meios a duas concentrações de glicerol, congelados em método rápido e ultrarrápido.

Meio	Glicerol	Método de congelamento	
		Rápido	Ultrarrápido
LAKE	6%	0,00 ± 0,00	0,63 ± 1,25
	12%	3,38 ± 5,79	0,00 ± 0,00
TRIS	6%	9,00 ± 2,20	18,13 ± 6,37
	12%	9,63 ± 5,14	16,25 ± 13,85
TES-TRIS	6%	12,25 ± 10,75	17,63 ± 4,68
	12%	25,25 ± 17,59	24,25 ± 14,26

média ± desvio padrão

#### 4- CONCLUSÕES

1 – A metodologia utilizada para coleta de sêmen de periquitos australianos mostrou-se eficiente no presente experimento, com volumes obtidos variando entre 0,5 a 10  $\mu$ l ( $3,95 \pm 2,5 \mu$ l) com uma concentração média  $12,58 \times 10^9 \pm 5,15$  spz/ml.

2 – Os meios Ringer com Lactato nos diferentes valores de pH e o Tris-citrato proporcionaram os maiores valores de motilidade e vigor dos espermatozoides, imediatamente após a diluição.

3 – As principais patologias espermáticas verificadas foram contorno anormal na cabeça e dobramento na peça intermediária e cauda foram.

4 – O meio diluidor Lake<sup>®</sup> manteve os valores de motilidade e vigor espermáticos mais elevados a partir de 24 horas de resfriamento a 5°C.

5 – Os meios diluidores em diferentes concentrações de glicerol e os protocolos utilizados para congelamento do sêmen de periquitos australianos testados resultaram em valores insatisfatórios de motilidade e vigor espermático pós-descongelamento.

6 – Os testes hiposmótico e coloração supravital demonstraram altos valores de inviabilidade espermática pós-descongelamento.

7 – O teste de coloração por fluorescência não possibilitou a visualização de coloração nos espermatozoides descongelados.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, S.J., Bird, D.M., Hagen, M.D. 2002. Semen characteristics of the quaker parakeet (*Myiopsitta monachus*). *Zoo Biol.* 21: 507-512.
- Ashizawa, K., Wishart, G.J. 1992. Factors from fluid of the ovarian pocket that stimulate sperm motility in domestic hens. *J. Reprod. Fertil.* 95: 855–860.
- Ax, R.L., Lodge, J.R. 1975. Rooster spermatozoa motility, forward progression, and fertility after storage at 25, 5, or -196 °C in various extenders. *Cryobiology.* 12: 93-7.
- Bakst, M.R., Wishart, G.J., Brillard, J.P. 1994. Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.* 5: 117–143.
- Biggers, J.D., Whitten, W.K., Whittingham, D.G. 1971. The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC Jr, ed. *Mammalian Embryology*. San Francisco, CA: Freeman p. 86–116.
- Birdlife International. 2000. *Threatened birds of the world*. Cambridge: Lynx Editions and Bird Life International. 852 p.
- Birkhead, T.R., Møller, A.P. 1992. *Sperm Competition in Birds - Evolutionary Causes and Consequences*. Academic Press, London, pp. 49–68.
- Bogdonoff, P.D., Schaffner, C.S., 1954. The effect of pH on in vitro survival, metabolic activity, and fertilizing capacity of chicken semen. *Poult. Sci.* 33: 665–669.
- Burrows, W.H., Quinn, J.P. 1935. A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poult. Sci.* 14: 253-254.
- Burrows, W.H., Quinn, J.P. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult. Sci.* 16:19-24.
- Christensen, V.L. 1995. Diluents, dilution, and storage of poultry semen for six hours. In: Bakst, M.R., Wishart, G.J. (Eds.), *Proc. First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. Poultry Science Association, Savoy, IL, pp. 90–106.
- Clark, R.N., Bakst, M.R., Ottinger, M.A. 1984. Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. *Pout. Sci.* 63: 801-805.

- Collar, N.J. 1997. Family Psittacidae (Parrots). In: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. Handbook of the birds of the world. Barcelona: Lynx Edicions. v.4. pp. 280-447.
- Crosta, L., Gerlach, H., Bürkle, H.M., Timossi, L. 2003. Physiology, diagnosis, and diseases of the avian reproductive tract. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 6: 57-83.
- Donoghue, A.M., Wishart, G.J. 2000. Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213–232.
- Evans, H.E. 1996. Anatomy of the budgerigar and other birds. In: Roskopf Jr, W.J., Woerpel, R.W. Diseases of cage and aviary birds. 3 Ed. USA (Baltimore): Williams & Wilkins. pp. 79-162.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology.* 29: 26–38.
- Henry, M., Neves, J.P. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2(ed), CBRA, Belo Horizonte. 49p.
- King, A.S., McLelland, J. 1984. Male reproductive system. In: King AS, McLelland J, editors. *Birds: Their structure and function.* 2nd edition. Philadelphia: Baillière Tindal pp. 166–74.
- Lake PE, Ravie, O. 1984. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br. Poult. Sci.* 25: 145–150.
- Lake, P.E., Ravie, O. 1979. Effect on fertility storing fowl semen for 24h at 5°C in fluids of different pH. *J. Reprod. Fertil.* 57: 149-155.
- Lake, P.E. 1978. The principles and practice of semen collection and preservation in birds. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 43: 31-49.
- Long, J.A. 2006. Avian semen cyopreservation: what are the biological challenges? *Poult. Sci.* 85: 232-236.
- Munro, S.S. 1938. Fowl sperm immobilization by a temperature-media interaction and its biological significance. *Q. J. Exp. Physiol.* 27: 281–287.
- Pollock, C.G., Orosz, S.E. 2002. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. *Vet Clin Exot Anim* 5: 441–474.

- Ravie, O., Lake, P.E. 1982. Prediction of ice formation in fowl spermatozoa at particular cooling rates. *Cryo-Lett.* 3: 91-100.
- SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1. 2007. Fundação Arthur Bernardes - UFV – Viçosa.
- Samour, J.H. 2002. The reproductive biology of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*): semen preservation techniques and artificial insemination procedures. *J Avian Med Surg.* 16: 39-49.
- Samour, J.H., Smith, C.A., Moore, H.D.M., Markham, J.A. 1986. Semen collection and spermatozoa characteristics in budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Rec.* 118: 397-399.
- Seigneurin, F., Blesbois, E. 1995. Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology.* 43: 1351-1358.
- Sexton, T.J. 1983. Maximizing the utilization of the male breeder: a review. *Poult. Sci.* 62: 1700-1710.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira. 912 p.
- Stelzer, G., Crosta, L., Bürkle, M., Krautwald-Junghanns, M.E. 2005. Attempted semen collection using the massage technique and semen analysis in various psittacine species. *J Avian Med Surg.* 19:7-13.
- Van de Laan, G.M. 2007. *Criopreservação de sêmen de galos*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). 55p.
- Van Wambeke, V.F., 1967. Storage of fowl sperm: Preliminary results with new diluents. *J. Reprod. Fertil.* 13: 571–575.
- Wishart, G.J. 1981. The effect of continuous aeration on the fertility of fowl and turkey semen stored above 0°C. *Br. Poult. Sci.* 22: 445–450.

## **CAPÍTULO II:** Avaliação histológica e funcional dos túbulos seminíferos de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805)

### **RESUMO**

O conhecimento do processo espermatogênico assim como informações básicas sobre a morfofisiologia reprodutiva subsidiam material imprescindível para desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida que podem ser aplicados em animais ameaçados de extinção, aumentando a sua reprodução em cativeiro. No presente experimento foi avaliado o processo espermatogênico de periquitos australianos. Foi aplicado 0,1 ml bromodeoxiuridina via sistêmica e quatro dias depois os testículos foram coletados e processados segundo técnica rotineira para inclusão em resina e parafina. Cortes em resina foram corados com azul de toluidina e analisados com técnicas qualiquantitativas enquanto os cortes em parafina foram corados segundo técnica imunocitoquímica. Foram verificados índices indicativos de alta produção espermática, como índice gonadossomático (1,4%) proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (97%), diâmetro médio do túbulo seminífero (314  $\mu\text{m}$ ), altura do epitélio seminífero (96,7  $\mu\text{m}$ ), 12,4 metros de túbulo seminíferos por grama de testículo, reserva espermática por grama de testículo ( $551,7 \times 10^6$ ), produção espermática diária ( $171,3 \times 10^6$ ) e produção espermática diária por grama de testículo ( $342,7 \times 10^6$ ). O arranjo celular ao longo do ciclo do epitélio seminífero foi semelhante àquele descrito em mamíferos, sendo possível a definição de 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero por meio da adaptação do método da morfologia tubular. Semelhante as demais espécies de aves estudadas, cinco a nove áreas com estádios distintos foram observados em uma única secção transversal do túbulo seminífero conferindo a característica helicoidal da espermatogênese. A frequência relativa dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de periquitos australianos foi: estágio 1 (9,35); estágio 2 (5,33); estágio 3 (26,09); estágio 4 (11,06); estágio 5 (22,28); estágio 6 (16,17); estágio 7 (5,89) e estágio 8 (3,84). Os estádios pré divisionais ou pré meióticos somaram 40,8%, o divisional ou meiótico 11% e os estádios pós divisionais ou pós meiótico somaram 48,2% seguindo a mesma tendência encontrada em codornas. A duração do ciclo do epitélio seminífero foi de 1,66 dias, menor que em todos os mamíferos e aves estudadas. Nas áreas correspondentes ao estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de periquito australiano,

foram observados, em média, 55,42 espermatogônias, 53,01 espermatócitos jovens, 44,68 espermatócitos velhos, 176,56 espermátides arredondadas e 7,06 células de Sertoli. Foi observada uma perda de aproximadamente 16% de espermatócitos durante a prófase meiótica. A perda registrada de espermátides arredondadas após as divisões meióticas não foi significativa sendo que das quatro células esperadas, cerca de 3,95 espermátides foram produzidas. Cada célula de Sertoli no epitélio seminífero foi capaz de sustentar e manter 46,72 células da linhagem germinativa, das quais 25,02 eram espermátides arredondadas.

**Palavras-chave:** espermatogênese; reserva espermática; morfometria; frequência de estádios; periquito australiano; *Melopsittacus undulatus*

## 1 – INTRODUÇÃO

A maioria das espécies de aves são reprodutoras sazonais, cujos mecanismos fisiológicos que regulam a gametogênese são sincronizados por estímulos do ambiente, assegurando que o nascimento de filhotes ocorra nos períodos anuais mais favoráveis à sua sobrevivência (Immelmann, 1971). A época de reprodução das aves do Brasil é indicada geralmente como sendo de setembro a janeiro, aparentemente de forma pouco dependente dos fatores climáticos observados nas diferentes regiões tropicais. Embora inúmeras variações ocorram entre as diferentes espécies de aves, a maior atividade de reprodução concentra-se em outubro, reduzindo em abril e maio, o que corresponde à primavera e ao outono austrais, respectivamente (Sick, 1997).

Apesar da fisiologia testicular em mamíferos ser estudada rotineiramente, há uma grande carência de informações sobre a morfofisiologia testicular das aves. Conseqüentemente não é possível tecer muitos comentários sobre a produção de células germinativas nas aves, assim como suas adaptações evolucionárias e fisiológicas, como as relacionadas à homeotermia e fertilização (Jones e Lin, 1993).

Diferentemente do testículo de mamíferos, as aves até aqui estudadas, apresentam túbulos seminíferos anastomosados, formando uma rede complexa no parênquima testicular. Este não se apresenta lobulado por septos provenientes da túnica albugínea como nos mamíferos (Jones e Lin, 1993; Pereira et al., 1994). No entanto, à semelhança daqueles, o testículo é dividido funcionalmente em dois compartimentos básicos: o tubular ou espermatogênico e o intertubular ou androgênico (Lofts e Murton, 1973).

Assim como para a maioria das aves silvestres, há poucos estudos sobre a morfofisiologia reprodutiva de psitacídeos, justificando a escassez de conhecimentos sobre a reprodução dessas aves. Desta forma o conhecimento do processo espermatogênico assim como informações básicas sobre a morfofisiologia reprodutiva fornecem material imprescindível para desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida que podem ser aplicados aumentando a população de indivíduos ameaçados de extinção.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo pormenorizado da estrutura do testículo, a caracterização do processo espermatogênico e a quantificação da espermatogênese em periquitos australianos, possibilitando a obtenção de dados que permitissem caracterizar a biologia reprodutiva desta espécie. Desta forma foram

investigados peso testicular e índice gonadossomático; estrutura do testículo por meio de microscopia de luz, caracterizando o compartimento tubular; cálculo das proporções volumétricas entre os componentes do testículo; cálculos do diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e do comprimento total dos túbulos seminíferos. Foram caracterizados os 8 estádios que constituem o ciclo do epitélio seminífero e realizada a estimativa da frequência relativa destes estádios e o cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero. Determinação da população celular do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. Cálculo do rendimento intrínseco da espermatogênese, índice meiótico e determinação das relações quantitativas entre células da linhagem espermatogênica e células de Sertoli, bem como estimativas da população de célula de Sertoli por testículo e produção espermática diária estimada através da histologia quantitativa.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Animais**

Foram utilizados três periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) machos adultos, com idade entre 12 e 24 meses, proveniente de criatório particular em Viçosa-MG, alocados nas dependências do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. As aves foram mantidas em viveiros de arame com dimensões de 100 cm de comprimento, 50 cm de largura e 120 cm de altura juntamente com outros indivíduos da mesma espécie. O sexo foi determinado por meio de dimorfismo sexual externo, com os machos apresentando coloração azul escuro da cera (carúncula nasal), localizada caudodorsalmente à inserção da rinoteca, enquanto as fêmeas a apresentam com coloração rósea.

Os animais receberam alimentação à base de mistura de sementes de painço e alpiste, ração peletizada específica para periquitos australianos (Alcon<sup>®</sup>), frutas, verduras e legumes diversos, além de água *ad libitum*. O presente projeto de pesquisa foi devidamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (protocolo número 58/2009), seguindo rigorosamente as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV.

A coleta do material procedeu-se no intervalo de setembro de 2009 a janeiro de 2010, período de maior luminosidade ambiental e conseqüentemente período de maior

expressão reprodutiva em psitacídeos (Peixoto, 2006). A área onde se desenvolveu o presente estudo corresponde às coordenadas 20°45'S e 42°52'W. A iluminação local era dotada com sincronizador analógico para se garantir um fotoperíodo diário de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Para tal foi utilizada uma lâmpada incandescente de 60W, mantida acesa nos intervalos de 05 às 07 e de 17 às 19 horas. A temperatura ambiental apresentou uma variação entre 25 a 30°C.

## **2.2 - Aplicação de bromodeoxiuridina (BrdU) e coleta de testículo**

Os animais foram contidos fisicamente com auxílio de uma toalha e através de canulação da veia braquial esquerda, foi aplicado 0,1 ml de solução comercial de bromodeoxiuridina, um análogo à timidina (Shimada et al., 2008). Em seguida o animal foi devolvido ao recinto, não demonstrando mudança de comportamento. Foi anotado o horário exato da aplicação.

Quatro dias após a aplicação do BrdU, o animal foi anestesiado com associação de cloridrato quetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg) via intramuscular, sendo posteriormente eutanasiado com 0,1 ml de lidocaína 2% aplicado via intratecal. O horário exato da eutanásia foi registrado para o cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero. Em seguida o animal foi dissecado para retirada dos testículos. Peso corporal e dos testículos foram aferidos em balança digital com precisão de 0,001 gramas. A partir destes dados foi calculado o índice gonadossomático, sendo este a proporção do peso corporal alocada em testículos. Após a coleta, os testículos foram imersos imediatamente em solução fixadora Karnovsky (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4%) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 a temperatura ambiente. A albugínea testicular foi perfurada com agulha hipodérmica para facilitar a penetração do fixador. Após 24 horas de fixação um dos testículos foi seccionado transversalmente e o contralateral longitudinalmente, sendo ambos conservados em álcool 70%.

## **2.3 - Processamento histológico**

Os fragmentos transversais e um longitudinal foram desidratados em bateria de etanol em concentrações crescentes (70, 80, 90, 100 GL) permanecendo uma hora em cada banho, com posterior infiltração de resina plástica (Histo-resin<sup>®</sup> Leica) em dois banhos e incluídos, na mesma resina, com a adição de endurecedor. O material foi

seccionado com navalha de vidro em micrótomo rotativo, no Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, obtendo-se cortes não sequenciais de 4 µm de espessura. Posteriormente foram corados com solução de azul de toluidina/borato de sódio 1%, para análise em microscópio de luz.

#### **2.4 - Análise morfológica testicular**

Por meio de fotografias digitais, capturadas em fotomicroscópio, de 20 campos aleatoriamente distribuídos no parênquima testicular de cada animal, foram quantificadas as proporções volumétricas dos compartimentos tubular e intertubular pela contagem de 100 pontos de interseção projetados por meio do programa *Power Point/ Windows XP*. As fotografias foram capturadas com aumento de 100X. A partir da proporção volumétrica foram calculados os volumes dos diferentes compartimentos com base no peso testicular, sendo considerada a densidade volumétrica testicular igual a 1, ou seja, peso igual a volume (Tae et al., 2005). Foi ainda calculado, para cada animal, o índice tubulossomático (ITS), este referente ao percentual do peso corporal alocado especificamente em túbulos seminíferos.

Para obtenção do diâmetro médio dos túbulos seminíferos foram mensuradas 20 secções transversais de túbulos com formato mais circular possível, em cada animal, em microscópio de luz com aumento de 100X. Essas mesmas secções transversais foram utilizadas para mensuração da altura média do epitélio seminífero. Uma vez que o túbulo seminífero representa geometricamente um cilindro, o cálculo do seu comprimento total foi realizado com base na fórmula do volume do cilindro em que: volume = área da base x altura. Assim, a área da secção transversal do túbulo seminífero foi calculada através do cálculo  $\pi r^2$  onde r correspondeu ao raio do túbulo seminífero, o volume correspondeu ao volume calculado para o total de túbulos seminíferos e a altura foi considerada como o comprimento total do túbulo seminífero.

Foram fotografadas 10 secções transversais de túbulos seminíferos, nos quais foram identificados os estádios do ciclo do epitélio seminífero presentes. A denominação e classificação destes estádios foi baseada em adaptações do método da morfologia tubular utilizado para mamíferos (Berndtson, 1977). Uma vez que a organização da espermatogênese em aves é do tipo helicoidal, com vários estádios observados na mesma secção transversal do túbulo seminífero, para avaliação da frequência relativa dos estádios foram mensuradas, por meio do software ImageJ<sup>®</sup> 1,42,

as áreas ocupadas por cada estágio e posteriormente calculadas suas frequências relativas totais. Nas áreas correspondentes ao estágio 1 foram também quantificadas as populações de: espermatogônias (SPTG), espermatócitos primários jovens (SPTCIj), espermatócitos primários velhos (SPTCIv), espermatídes arredondas (AR) e células de Sertoli (S). Como estas populações foram aferidas em áreas parciais da secção transversal do túbulo, os valores encontrados em cada população foram extrapolados para a área total da secção transversal do túbulo. Devido às diferenças no tamanho dos tipos celulares computados, as populações celulares obtidas foram corrigidas numericamente considerando-se a espessura do corte e o diâmetro nuclear, utilizando-se para isto a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann (1961):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

A partir destas populações foram determinados: coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (SPTCIj/SPTG), coeficiente de eficiência da prófase meiótica (SPTCIv/SPTCIj), rendimento meiótico (AR/SPTCIv), rendimento geral da espermatogênese (AR/SPTG), índices de células de Sertoli por total de células espermatogênicas ((SPTG + SPTCIj + SPTCIv+ AR)/ S) e índice de célula de Sertoli por espermatíde arredondada (AR/S).

A reserva espermática testicular por ciclo do epitélio seminífero foi calculada com base na população de espermatídes arredondadas em uma secção transversal do túbulo seminífero em espessura de 4 µm extrapolada para o comprimento total do túbulo seminífero.

Um fragmento longitudinal do testículo foi submetido à desidratação em série crescente de alcoóis 70, 80, 95 e 100 GL durante uma hora em cada banho, e posterior diafanização em dois banhos de xilol consecutivos até a inclusão em parafina. O bloco resultante foi seccionado em micrótomo rotativo, no Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, obtendo-se cortes seqüenciais de 5 µm de espessura. As preparações com material previamente submetido à bromodeoxiuridina,

foram então submetidas à detecção por anticorpo monoclonal e revelados usando coloração pelo sistema biotina-estreptavidina. Para tal o material foi inicialmente desparafinado e reidratado, lavado em tampão fosfato (PBS) e a atividade peroxidase bloqueada endogenamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após novo banho com PBS procedeu-se à desnaturação do DNA por 2N HCl, novo banho em PBS para o pré tratamento enzimático que foi realizado com incubação em solução de tripsina. Após o último banho com PBS foi realizado o procedimento de bloqueio de reações cruzadas com soro de cabra a 5%, para a incubação com anticorpo monoclonal biotinilado anti BRDU de camundongo revelado com reação estreptavidina peroxidase (GZYMED BrdU staining Kit).

A duração do ciclo do epitélio seminífero foi calculada por meio da detecção da célula mais avançada no epitélio a apresentar marcação. Desta forma foi calculada a frequência total dos estádios percorridos, desde a incorporação da BrdU, nos espermatócitos jovens, na aplicação, até a marcação da célula mais avançada, na coleta do material. A frequência dos estádios percorridos corresponde ao intervalo de tempo decorrido, sendo calculado o período relativo a de um ciclo do epitélio seminífero.

## **2.5 - Análise estatística**

Os dados foram analisados por estatística descritiva, sendo obtida a média e desvio padrão dos parâmetros estudados. Para tal empregou-se a função estatística do programa *Microsoft Office Excel® 2003*.

### 3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Saxonalidade e índice gonadossomático

A maioria das espécies de aves são reprodutores sazonais, cujos mecanismos fisiológicos que regulam a gametogênese são sincronizados por estímulos do ambiente, que asseguram o nascimento de filhotes nos períodos anuais mais favoráveis à sua sobrevivência (Immelmann, 1971). Peixoto (2006) descreve uma clara influência da luminosidade sobre parâmetros qualiquantitativos do testículo de periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma*). Nestes animais valores significativamente maiores de proporção volumétrica de túbulos seminíferos, diâmetro médio dos túbulos seminíferos e grau de desenvolvimento espermatogênico são observados na primavera em relação ao outono, no qual são registrados os menores valores para esses parâmetros.

No presente experimento a coleta foi realizada durante o verão, período de maior luminosidade e como esperado os testículos apresentavam características de intensa produção espermática. O peso médio de ambos os testículos observado foi de 0,5 g (Tabela 1), próximo aos valores registrados para a mesma espécie, em condições laboratoriais de 14 h de luz/dia (Samour, 2002). A massa testicular é diretamente relacionada à produção espermática e o índice gonadossomático (IGS), em mamíferos, é utilizado na previsão de estratégias reprodutivas, sendo que aqueles animais com grandes IGS apresentam comportamento poliândrico ou promíscuo e animais com pequenos percentuais de investimento corporal em testículos geralmente apresentam estratégias reprodutivas poligínicas ou monogâmicas (Kenagy e Trombulak, 1986; Dixon e Birkhead, 1997). Poucos trabalhos são observados neste tema em aves. No presente experimento o percentual de peso corporal alocado em testículos em periquitos australianos foi de 1,4% valor superior à maioria dos mamíferos domésticos e silvestres estudados (França e Russell, 1998; Paula et al., 2007). Lake (1981) relata que a maioria das aves apresenta IGS próximo a 1% durante o período reprodutivo. Dos poucos trabalhos abordando relações do IGS com o comportamento reprodutivo observados em aves, as correlações descritas para mamíferos não parecem se aplicar. Assim, a codorna que sabidamente apresenta comportamento poligínico apresenta um IGS de 2,26% (Jones e Lin, 1993) superior ao registrado em aves descritas como poliândricas como o pukeko (*Porphyrio porphyrio melanotus*) uma espécie de frango d'água natural da Nova Zelândia, que apresenta IGS de 0,42% (Gunn et al., 2008). Neste sentido, embora

psitacídeos sejam descritos como monogâmicos (Sick, 1997), seria mera especulação a inclusão dos periquitos australianos em uma categoria apenas pelo registro do IGS.

Tabela 1: Parâmetros biométricos de periquitos australianos

Ave	Peso corporal (g)	Peso testículo esquerdo (g)	Peso testículo direito (g)	Peso total dos testículos (g)	IGS %
1	34,75	0,2	0,26	0,46	1,32
2	36,82	0,16	0,24	0,40	1,09
3	34,47	0,27	0,37	0,64	1,86
<b>Média ± d.p.</b>	35,35 ± 1,28	0,21 ± 0,06	0,29 ± 0,07	0,5 ± 0,12	1,42 ± 0,39

d.p. desvio padrão

### 3.2 - Testículo e túbulo seminífero

Os órgãos reprodutores dos machos das aves são constituídos bilateralmente por testículos, epidídimos e ductos deferentes, localizados no interior da cavidade celomática (Jones e Lin, 1993). Os testículos estão suspensos por uma pequena prega peritoneal, o mesórquio, situando-se medialmente ao pólo cranial dos rins. Em alguns machos, e na maioria das fêmeas em procriação, as gônadas podem estender-se sob todo o pólo cranial dos rins, inclusive até as adrenais. O testículo é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular, envolta pela túnica *vaginalis*, que se trata de uma extensão do peritônio (Kirby e Froman, 2000). Tais características também foram observadas nas aves do presente experimento.

O parênquima testicular das aves, assim como o dos periquitos australianos deste estudo, apresenta semelhança com o observado em mamíferos, com a presença de uma massa de túbulos seminíferos convoluídos e agrupamentos intertubulares de tecido conjuntivo frouxo, contendo capilares sanguíneos, espaços linfáticos e células intersticiais de Leydig, sendo estas produtoras de hormônios esteróides sexuais (Lofts e Murton, 1973). Desta forma o testículo pode ser dividido funcionalmente em dois compartimentos básicos: o tubular ou espermato gênico e o intertubular ou androgênico (Lofts e Murton, 1973).

Segundo vários autores a albugínea testicular das aves não envia septos conjuntivos para o centro dos testículos dividindo-o em lóbulos, como ocorre em mamíferos e ainda diferente destes, as aves apresentam túbulos seminíferos anastomosados, formando uma rede complexa no parênquima testicular. (Lofts e Murton, 1973; Jones e Lin, 1993; Pereira et al., 1994; Peixoto, 2006). No presente experimento, em concordância a estes autores, não foram observados septos conjuntivos no parênquima testicular, porém, não foram observadas anastomoses tubulares conforme descrito.

A proporção entre os compartimentos testiculares é bastante variável, sendo um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada para a eficiência na produção espermática nas diversas espécies (Russell et al., 1990b; França e Russell, 1998). Nos animais do presente experimento o túbulo seminífero foi o principal componente testicular ocupando em média 97% do parênquima (Tabela 2). Valores altos também são registrados em outra espécie de psitacídeo como o periquitão maracanã (*Aratinga leucophthalma*) (Peixoto, 2006) e em aves de outras ordens como faisões coreanos (Tae et al., 2005), galinha d'angola (Aire et al., 1980), galos domésticos (de Reviere, 1971) e perus (Noirault et al., 2006).

Tabela 2: Proporção volumétrica (%) e volume dos principais componentes do parênquima testicular e índice tubulossomático do testículo de periquitos australianos.

Ave	Proporção de túbulo seminífero (%)	Proporção de intertúbulo (%)	Volume de túbulo seminífero (ml)	Volume de intertúbulo (ml)	ITS
1	97,06	2,94	0,45	0,01	1,28
2	97,19	2,81	0,39	0,01	1,06
3	96,28	3,72	0,62	0,02	1,79
<b>Média ± d.p.</b>	96,84± 0,49	3,16 ± 1,51	0,49 ± 0,12	0,01 ± 0,01	1,38 ± 0,37

d.p. - desvio padrão

ITS- Índice tubulossomático

A medida do diâmetro tubular é uma das principais abordagens utilizadas como indicador da atividade espermatogênica em experimentos que envolvam a função testicular (França e Russell, 1998; Bitencourt et al., 2004; Costa et al., 2006; Costa et al., 2007; Azevedo et al., 2010). No presente experimento, o diâmetro médio do túbulo seminífero foi cerca de 314  $\mu\text{m}$  (Tabela 3), acima dos valores observados na maioria dos mamíferos estudados, embora o diâmetro tubular médio possa chegar a 550  $\mu\text{m}$  em algumas espécies de marsupiais (Woolley, 1975), o valor tipicamente observado para a maioria dos amniotas varia de 180 a 300  $\mu\text{m}$  (Roosen-Runge, 1977; França e Russell, 1998; Bitencourt et al., 2004; Costa et al., 2006; Costa et al., 2007; Azevedo et al., 2010). Em aves de produção o diâmetro médio do túbulo seminífero e a espessura do epitélio seminífero também são índices utilizados como aferidores da atividade gametogênica (Amoroso et al., 2008). Segundo estes autores, em codornas, o diâmetro médio do túbulo seminífero no pico de produção, entre 120 e 130 dias de idade é de 460  $\mu\text{m}$ , bem acima do observado no presente estudo em periquitos australianos. Já em comparação com aves não selecionadas para produção, como a perdiz (*Rynchotus rufescens*), o diâmetro médio do túbulo seminífero (315  $\mu\text{m}$ ) foi semelhante (Artoni et al., 1999). Peixoto (2006), em estudo com outra espécie de psitacídeo (*Aratinga leucophthalma*), avaliada também na estação reprodutiva, registrou valores cerca de 60% inferiores aos registrados em periquitos australianos.

Tabela 3: Valores médios de diâmetro de túbulo seminífero, espessura do epitélio seminífero, comprimento total de túbulo seminífero e comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo.

Ave	Diâmetro de túbulo seminífero ( $\mu$ )	Espessura do epitélio seminífero ( $\mu$ )	Comprimento total de túbulo seminífero (m)	Comprimento de túbulo seminífero (m) por grama de testículo
1	313.96	93.54	5.77	12.54
2	316.82	104.93	4.93	12.33
3	312.17	91.88	8.05	12.58
<b>Média <math>\pm</math> d.p.</b>	314.32 $\pm$ 2,35	96.78 $\pm$ 7,10	6.25 $\pm$ 1,61	12.48 $\pm$ 0,13

d.p. – desvio padrão

Segundo Wing e Christensen (1982) diferenças significativas no diâmetro tubular ao longo do túbulo, podem ser observadas acompanhando as variações do ciclo do epitélio seminífero. Assim, a mensuração da espessura do epitélio seminífero parece ser mais efetiva para a avaliação da produção espermática do que o diâmetro tubular. No presente experimento a espessura média do epitélio seminífero de periquitos australianos foi 96,7  $\mu\text{m}$  (Tabela 3), próximo aos 80  $\mu\text{m}$  observados na perdiz (*Rynchotus rufescens*) (Artoni et al., 1999), porém, superior ao observado para a maioria dos mamíferos estudados (entre 67 e 90 $\mu\text{m}$ ; Godinho, 1999; Sarti et al., 2006; Guião Leite e Paula, 2003; Barros et al., 2004; Azevedo et al., 2006). Acompanhando o observado no diâmetro tubular, a espessura epitelial em periquitos foi inferior aos valores observados em codornas de produção (120  $\mu\text{m}$ ; Amoroso et al., 2008).

O comprimento de túbulos seminíferos é um parâmetro quantitativo diretamente relacionado à produção espermática, pois embora dependa inversamente do diâmetro tubular, reflete o volume epitelial espermático. A quantificação total de túbulos em uma determinada espécie é uma abordagem pouco comparativa visto as diferenças inerentes ao tamanho gonadal. Assim, a estimativa do comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo torna-se essencial. Em periquitos australianos observou-se cerca de 12,4 metros de túbulo seminíferos por grama de testículo (Tabela 3), valor este dentro da amplitude observada em mamíferos domésticos (França e Russell, 1998) e silvestres estudados (Guião Leite e Paula, 2003; Barros et al., 2004; Azevedo et al., 2006; Bittencourt et al., 2007; Sarti et al., 2006; Caldeira, 2007).

### **3.3 - Estádios do ciclo do epitélio seminífero**

As avaliações do processo espermatogênico são geralmente realizadas em secções transversais do túbulo seminífero, onde é possível a visualização de 4 a 5 camadas concêntricas de células germinativas. Cada camada é composta por uma geração celular em uma fase específica de desenvolvimento, caracterizada por um acurado desenvolvimento sincrônico, uma vez que todas as células de determinada geração apresentam-se interligadas por pontes citoplasmáticas. As diferentes gerações observadas no epitélio seminífero ao longo da secção transversal do túbulo, dispõem-se em uma sequência de maturação crescente da base para o lume tubular. Assim, cada camada representa uma geração distinta em uma fase de desenvolvimento mais

avançada em relação à camada abaixo. Desta forma, há um fluxo contínuo de migração ascendente das camadas, de modo que uma nova geração de células é formada na base do túbulo ao mesmo tempo que uma geração totalmente desenvolvida é liberada no lume tubular. As associações observadas entre as diferentes camadas do epitélio seminífero, ao longo do ciclo espermatogênico, não se apresentam aleatórias e sim restritas a 8 arranjos morfológicos específicos, identificados como estádios do ciclo do epitélio seminífero por Berndtson (1977). Uma sequência completa de aparecimento dos 8 estádios em um determinado ponto do túbulo seminífero, é denominado ciclo do epitélio seminífero e representa o intervalo de tempo necessário para a migração de uma geração celular para a camada seguinte no epitélio.

No periquito australiano, à semelhança do discutido por Lin et al. (1990) em codornas, independente da metodologia utilizada na classificação, o arranjo celular ao longo do ciclo do epitélio seminífero é semelhante àquele descrito em mamíferos (Russell et al., 1990b; Guião Leite e Paula, 2003; Barros et al., 2004; Azevedo et al., 2006; Bittencourt et al., 2007; Sarti et al., 2006; Caldeira, 2007). Assim, foi possível a definição de 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero por meio da adaptação do método da morfologia tubular (Berndtson, 1977), embora, assim como nas demais espécies de aves estudadas, de cinco a nove áreas com estádios distintos tenham sido observados em uma única secção transversal do túbulo seminífero (Figura 1) (Clermont, 1958; Yamamoto et al., 1967; Aire et al., 1980; Jones e Lin, 1993; Kirby e Froman, 2000). Este arranjo é diferente do observado para mamíferos não primatas, cuja organização tubular define segmentos tubulares contento um único estádio do ciclo ao longo do túbulo seminífero (Russell et al., 1990b). A organização da espermatogênese das aves é denominada helicoidal (Jones e Lin, 1993).

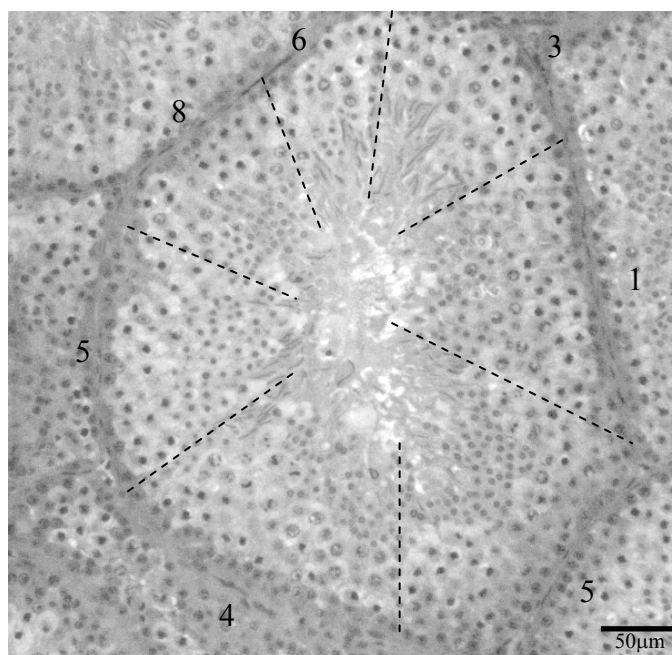


Figura 1: Fotomicrografia de túbulo seminífero de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), seccionado transversalmente, apresentando sete associações celulares delimitadas por linhas tracejadas. Os números correspondem aos estádios do ciclo do epitélio seminífero. Azul de toluidina.

A classificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em todas as aves estudadas é baseada em uma metodologia denominada método do sistema acrossômico, distinta daquele método da morfologia tubular. O método do sistema acrossômico é baseado na ocorrência e classificação dos diferentes graus de desenvolvimento do acrossoma das espermatídes. Desta forma, como são observadas diferenças espécie-específicas no desenvolvimento acrossômico, por este método, mesmo o número de estádios diferem entre as espécies, não sendo possível a comparação interespecífica. Uma vez que o método da morfologia tubular é baseado na ocorrência das diferentes gerações celulares no epitélio seminífero, descrições detalhadas pelo método do sistema acrossômico são passíveis de conversão para a morfologia tubular. No presente trabalho foi desenvolvida uma classificação baseada no método da morfologia tubular em periquitos australianos no intuito de facilitar a comparação com outras espécies de aves e mamíferos. Os diferentes estádios propostos no periquito australiano são descritos e visualizados a seguir (Figura 2 e Figura 3).

Estádio 1- (Figura 2-1 e figura 3-1) - Este estágio foi caracterizado pelo grande número de espermatogônias na base do epitélio seminífero, duas gerações de espermatócitos primários sendo uma mais jovem em zigóteno inicial e uma mais antiga em paquíteno. Foi observada ainda uma geração abundante de espermátides arredondadas na camada mais luminal do epitélio, sem a presença de espermátides alongadas.

Estádio 2- (Figura 2-2 e figura 3-2) – Neste estágio grande população de espermatogônias também é visualizada na base do epitélio, duas gerações de espermatócitos são observadas nas camadas intermediárias, e semelhante ao observado no estágio 1 são verificadas presença de zigótenos e paquítenos. As espermátides arredondadas tornam-se em fase inicial de alongamento.

Estádio 3- (Figura 2-3 e figura 3-3) – Neste estágio é observado população de espermatogônias comparável aos estádios anteriores, a geração de espermatócitos primários jovens permanece com zigóteno enquanto a geração mais antiga de espermatócito é observada em diplóteno. As espermátides ainda apresentam-se na fase de alongamento sendo organizadas em feixes bem definidos.

Estádio 4- (Figura 2-4 e figura 3-4) - Neste estágio é observado população de espermatogônias comparável aos estádios anteriores, a população de espermatócitos jovens permanece na fase de zigóteno enquanto a geração mais antiga desaparece com a primeira e segunda divisão meiótica, sendo possível a identificação desde placas metafásicas; espermatócitos secundários até espermátides arredondadas recém formadas. As espermátides alongadas apresentam núcleo mais condensado.

Estádio 5- (Figura 2-5 e figura 3-5) - Neste estágio é observado população de espermatogônias comparável aos estádios anteriores. O estágio 5 é o único a registrar apenas uma geração de espermatócitos, estando esta na transição zigóteno-paquíteno. Observa-se a geração de espermátides arredondadas recém formadas, com grânulos de cromatina bem visível. A geração de espermátides alongadas apresenta abundante citoplasma.

Estádio 6- (Figura 2-6 e figura 3-6) – Neste estágio é observado população reduzida de espermatogônias em comparação ao estágio anterior. Uma geração recém formada de espermatócitos é observada em preleptóteno próximo a região basal. A geração antiga de espermatócito primário é observada na fase de paquíteno. A geração de espermátides arredondadas é semelhante ao estágio 5 e as espermátides alongadas apresentam volume reduzido de citoplasma.

Estádio 7- (Figura 2-7 e figura 3-7) – Observa-se maior número de espermatogônias próximo à membrana basal em relação ao estágio anterior. A geração jovem de espermatócitos primários apresenta-se na transição leptóteno zigóteno, enquanto a geração antiga apresenta-se em paquíteno. É observada ainda a geração de espermátides arredondadas com núcleo mais claro e densidade mais uniforme. A geração de espermátides alongadas apresenta citoplasma reduzido e pode-se observar a presença de corpos residuais.

Estádio 8- (Figura 2-8 e figura 3-8) – Uma grande geração de espermatogônias é observada na base do epitélio. A geração de espermatócitos primários jovens já é observada na fase de zigóteno e a antiga permanece em paquíteno. Espermátides arredondadas apresentam núcleo esférico e coloração homogênea. Já as espermátides alongadas apresentam-se em fase de espermição, com presença de corpos residuais.

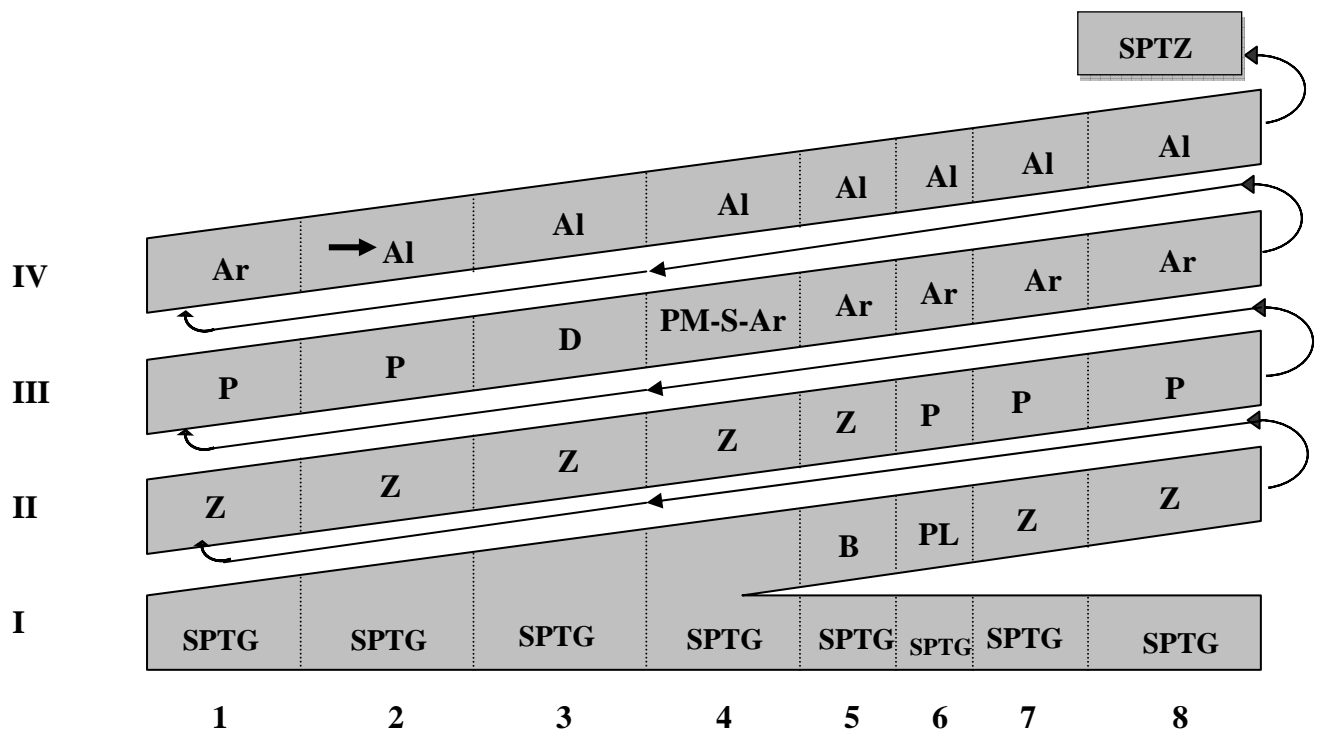


Figura 2: Diagrama do processo espermatogênico, onde os números romanos (linhas) indicam o ciclo espermatogênico e os números arábicos (colunas) indicam os 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero. A célula germinativa marcada mais avançada (seta) nos oito estádios do ciclo, após quatro dias da injeção com BrdU, foi a espermátide em processo de alongamento no estágio 2. Espermatogônia (SPTG), espermatogônia do tipo B (B), espermatócito primário: em preleptóteno (PL), em zigóteno (Z), em paquíteno (P), em diplóteno (D); placa metafásica (PM), espermatócito secundário (S), espermátide arredondada (Ar), espermátide alongada (Al) espermatozóide (SPTZ).

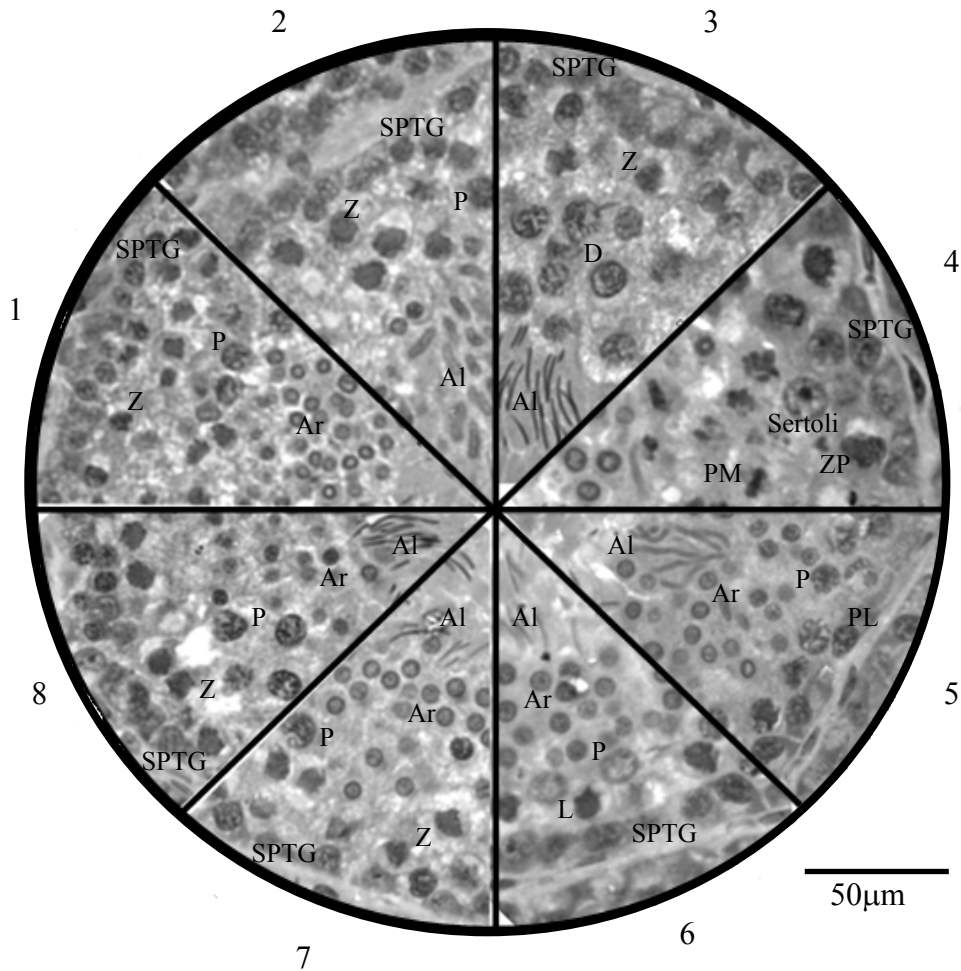


Figura 3: Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero do periquito australiano. Estádio 1 (1), estágio 2 (2), estágio 3 (3), estágio 4 (4), estágio 5 (5), estágio 6 (6), estágio 7 (7) e estágio 8 (8). Espermatogônia (SPTG), pré-leptóteno (PL), leptóteno (L), zigóteno (Z), paquíteno (P), diplóteno (D), placa metafásica (PM), espermátide arredondada (Ar) e espermátide alongada (Al). Azul de toluidina.

A frequência relativa de cada um dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é um parâmetro importante na predição da duração do ciclo, uma vez que a frequência da ocorrência de cada estágio é diretamente relacionada com a sua duração. Assim, estádios mais frequentemente observados são também aqueles mais demorados e em um apanhado geral é possível observar a duração relativa entre todos os estádios. A frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero do periquito australiano é apresentada na tabela 4. Em aves o único trabalho encontrado na literatura que estima a frequência relativa dos estádios individualmente é o descrito por Lin et al. (1990) em codornas, porém a metodologia utilizada para definição dos estádios é o método do sistema acrossômico o qual define 10 estádios distintos daqueles definidos no ciclo espermatogênico de periquitos australianos no presente trabalho. Desta forma, para fins comparativos, é possível agrupar os estádios com base na ocorrência das divisões meióticas como: pré divisionais ou pré meióticos, divisionais ou meióticos e pós divisionais ou pós meióticos, sendo os estádios divisionais ou meióticos aqueles com o aparecimento de figuras de divisão meiótica de espermatócitos primários e secundários até a formação das espermátides arredondas. Pelo método da morfologia tubular o estágio divisional é o estágio 4 enquanto pelo método do sistema acrossômico seriam os estádios 9 e 10. Assim em periquitos australianos os estádios pré divisionais somam 40,8%, o divisional 11% e os estádios pós divisionais somam 48,2%. Em codornas, segundo Lin et al. (1990), o estágio divisional apresenta frequência semelhante (9,2%) e observa-se ainda a mesma tendência de maiores frequências nos estádios pós divisionais em detrimento dos estádios divisionais.

Tabela 4: Frequência relativa e duração dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero do periquito australiano.

	Estádio							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Frequência (%)</b>	9,35±3,07	5,33±2,42	26,09±9,71	11,06±2,79	22,28±4,11	16,17±0,22	5,89±0,27	3,84±1,67
<b>Duração (h)</b>	3,74	2,13	10,42	4,42	8,9	6,46	2,35	1,53

### 3.4 - População do epitélio e rendimento intrínseco da espermatogênese

A grande dificuldade da estimativa da população celular em aves refere-se ao tipo de organização helicoidal da espermatogênese. Assim, enquanto nos mamíferos, com organização segmentada, a população das diferentes gerações celulares do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero é calculada em uma secção transversal do túbulo seminífero, em aves é necessário a extrapolação dos segmentos de regiões correspondentes ao estágio 1 para a área total da secção transversal tubular. Nas áreas correspondentes ao estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de periquito australiano, foram observados em média 55,42 espermatogônias, 53,01 espermatócitos jovens, 44,68 espermatócitos velhos, 176,56 espermatídes arredondadas e 7,06 células de Sertoli (Tabela 5).

Tabela 5: População celular corrigida, por área de secção transversal de túbulo, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*).

	SPTG	SPTCj	SPTCv	AR	S
<b>Média</b>	55,42 ± 7,70	53,01 ± 14,84	44,68 ± 16,02	176,56 ± 48,76	7,06 ± 3,31
<b>±d.p.</b>					

d.p. desvio padrão

SPTG – Espermatogônia

SPTCj – Espermatócito jovem

SPTCv – Espermatócito velho

AR – Espermatíde arredondada

S – Célula de Sertoli

Em codornas japonesas foram identificados quatro tipos de espermatogônia: Ad ou *dark* e Ap ou *pale*, assim denominadas pela diferença na intensidade de coloração (Lin e Jones, 1992). As espermatogônias Ap ainda podem ser subdivididas em Ap1 e Ap2 por meio de diferenças ultraestruturais. Ainda pode ser diferenciado na codorna a espermatogônia B, que é um estágio precedente aos espermatócitos (Jones e Lin, 1993). Baseado no modelo proposto por Lin e Jones (1992) uma espermatogônia Ad se dividirá em uma Ad que permanece como célula tronco e uma Ap1 que segue no processo de divisão e diferenciação em Ap2 (n=2), B (n=4), espermatócito primário (n=8), espermatócito secundário (n=16) e espermatíde arredonda (n=32). No presente experimento, foram observadas abundantes populações no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, porém, não foram identificadas as diferentes gerações de espermatogônias.

Assim não foi determinada a população de espermatogônias tronco ou iniciais. Aparentemente várias gerações de espermatogônias de diferentes ciclos estão presentes no estágio 1, sendo necessário um estudo qualitativo para a determinação da cinética espermatogonial. Desta forma o rendimento de mitoses espermatogoniais (CEME) em periquitos australianos (Tabela 6), não reflete necessariamente a produção de uma espermatogônia inicial na produção de espermatócitos primários, estando desta forma, muito abaixo da amplitude observada em mamíferos de 14,6 a 24,8 espermatócitos primários jovens produzidos a cada espermatogônia inicial (França e Russell, 1998).

Tabela 6: Rendimento intrínseco da espermatogênese e índice de células de Sertoli de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*)

	CEME	CEPM	RM	RGE	ICS/ total	ICS/AR
<b>Média</b>	0.96	0.84	3.95	3.19	46.72	25.02

CEME – Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais  
 CEPM – Coeficiente de eficiência da prófase meiótica  
 RM – Rendimento meiótico  
 RGE – Rendimento geral da espermatogênese  
 ICS/total – Índice de célula de Sertoli por total de células espermatogênicas  
 ICS/AR – Índice de célula de Sertoli por espermatíde arredondada

O rendimento espermatogênico não alcança os 100% previstos teoricamente, pois células defeituosas ou aquelas que ultrapassem a capacidade de suporte das células de Sertoli entram em apoptose e são eliminadas a qualquer ponto do ciclo (Huckins, 1978; De Rooij & Janssen, 1987; De Rooij & Lok, 1987; Sharpe, 1994; De Rooij, 1998). A prófase meiótica é teoricamente uma fase de manutenção populacional em que os espermatócitos primários preparam-se para as divisões meióticas subseqüentes, porém, uma perda populacional é sempre computada devido a apoptoses de células defeituosas. No presente estudo foi observada perda de aproximadamente 16% de espermatócitos durante a prófase meiótica (Tabela 6), valor este muito próximo ao registrado nos mamíferos estudados (França e Russell, 1998; Azevedo et al., 2006; Barros et al., 2007; Balarini, 2008).

Durante as divisões meióticas é que ocorrem as maiores perdas celulares em mamíferos, cerca de 12 a 33% das espermatídes arredondadas esperadas ao fim desta fase são perdidas (Guião Leite e Paula, 2003; França e Godinho, 2003; Azevedo et al., 2006; Sarti, 2006; Barros et al., 2007; Balarini, 2008). Em periquitos australianos a

perda registrada de espermátides arredondadas durante as divisões meióticas não foi significativa sendo que das quatro células esperadas, cerca de 3,95 espermátides foram produzidas (Tabela 6), não sendo possível a determinação desta alta eficiência como uma característica das aves em geral devido a falta de dados na literatura.

O rendimento geral da espermatogênese é uma mensuração da eficiência do processo espermatogênico como um todo, e é calculado a partir da população de espermátides arredondadas por secção transversal do túbulo seminífero. Sua confiabilidade como um índice de avaliação da produção de espermatozóides baseia-se no fato de que perdas durante o processo espermiogênico são consideradas pequenas e não significativas (Amann, 1970; Berndtson, 1977; Russell & Peterson, 1984; Johnson et al., 2000). No entanto, em periquitos australianos o rendimento geral da espermatogênese é de apenas 3,19 células (Tabela 6), muito inferior ao observado na maioria dos mamíferos estudados nos quais cerca de 37,4 a 74,2 espermátides arredondadas são produzidas a partir de cada espermatogônia inicial (França e Russell, 1998). Esta discrepância, antes de refletir uma baixa produção no periquito australiano, deve-se ao fato de haver gerações concomitantes de espermatogônias iniciais e tardias durante o estágio I reforçando a necessidade de um estudo cinético nesta espécie.

Apesar da produção espermática estar diretamente relacionada com o tamanho testicular (Amann 1970; França e Russell, 1998) os índices de capacidade suporte da célula de Sertoli são efetivamente os melhores indicativos da capacidade de produção espermática em uma dada espécie (Berndtson et al., 1983; Queiroz e Cardoso, 1989; França e Russell, 1998). As interações entre a célula de Sertoli e as células germinativas são cruciais para a manutenção da produção espermática normal. A célula de Sertoli desempenha papel fundamental na morfofisiologia da espermatogênese e suas funções incluem desde a sustentação física das células germinativas, até a produção de inúmeros fatores parácrinos/autócrinos que modulam a produção espermática (Griswold, 1995). No testículo de periquito australiano foram encontradas 7,06 células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero em estágio I do ciclo do epitélio, valor muito próximo ao observado em mamíferos (Balarini, 2008).

Cada célula de Sertoli no epitélio seminífero do periquito australiano foi capaz de sustentar e manter 46,72 células da linhagem germinativa, das quais 25,02 eram espermátides arredondadas (Tabela 6). Entre as diferentes espécies de mamíferos estudados a capacidade de suporte das células de Sertoli é muito variada sendo esta capacidade, uma relação espécie-específica (Russell e Peterson, 1984; França e Russell,

1998; França et al., 1999). Porém os valores observados em periquitos australianos foram muito acima das médias registradas nesses animais (França e Russell, 1998; França e Godinho, 2003; Guião Leite e Paula, 2003; Azevedo et al., 2006; Sarti, 2006; Barros et al., 2007; Balarini, 2008).

### **3.5 - Duração do ciclo e produção espermática diária**

A duração do ciclo do epitélio seminífero e a frequência relativa de seus estádios são constantes biológicas espécies específicas, às quais estão sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998), não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (Clermont, 1972; Amann e Schanbacher, 1983). A BrdU utilizada é incorporada ao núcleo das células germinativas que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especificamente espermatogônias e espermatócitos primários, estimados, no periquito australiano, como sendo produzidos no estágio 6 e 7 do ciclo do epitélio seminífero. Portanto, coletaram-se fragmentos testiculares aproximadamente 4 dias após a injeção de BrdU e as células marcadas mais avançadas no epitélio seminífero destes animais, foram espermátides em alongamento no estágio 2 do ciclo do epitélio seminífero (Figura 4). Portanto em 4 dias houve uma progressão de cerca de 240,5%, frequência média dos estádios 6 do ciclo inicial até o estágio 2 do terceiro ciclo no epitélio seminífero, onde foi observada marcação. Conseqüentemente um ciclo corresponde em média 1,66 dias (Tabela 7), valor inferior ao observado na duração do ciclo do epitélio seminífero da codorna que foi de 2,69 dias (Lin et al., 1990) e do galo doméstico cerca de 3 a 4 dias (de Reviers, 1968). A duração de todo o processo espermatogênico na codorna, ou seja da produção da espermatogônia Ad até a espermiação, foi calculado em 12,8 dias com um total de 4,75 ciclos estimados (Lin e Jones, 1992). Em periquitos australianos não foi determinado a cinética espermatogonial, não sendo desta forma possível a previsão exata do número de ciclos utilizados para o processo espermatogênico total.

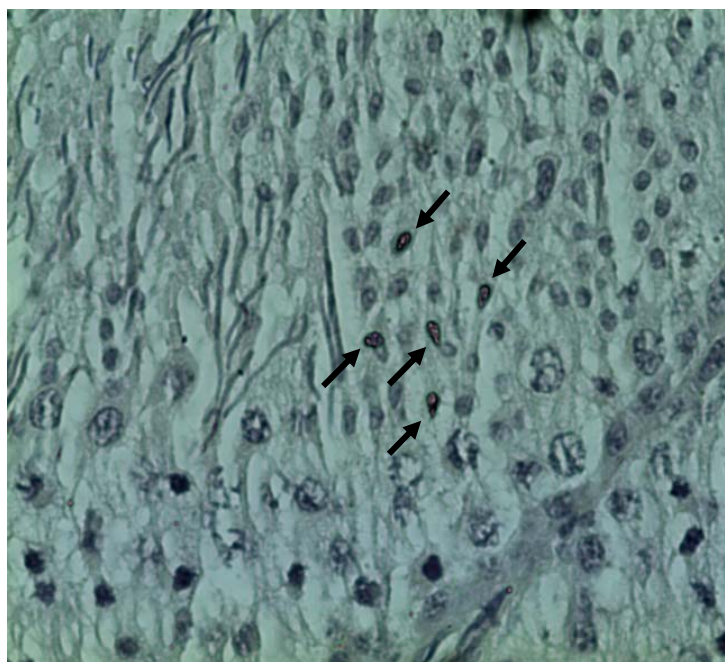


Figura 4: Estádio 2 do ciclo do epitélio seminífero de periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), após 4 dias da aplicação de BrdU, demonstrando marcação (setas) em espermátides em alongamento.

Tabela 7: Duração do ciclo do epitélio seminífero, reserva espermática, produção espermática diária e produção espermática diária por grama de testículo de periquito australiano

	Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias)	Reserva espermática	Reserva espermática por grama de testículo	Produção espermática diária	Produção espermática diária por grama de testículo
<b>Média</b>	1,66	275,9 x 10 <sup>6</sup>	551,7 x 10 <sup>6</sup>	171,3 x 10 <sup>6</sup>	342,7 x 10 <sup>6</sup>
<b>Desvio padrão</b>	-	19,7 x 10 <sup>6</sup>	-	19,7 x 10 <sup>6</sup>	157 x 10 <sup>6</sup>

A determinação da taxa de produção espermática possibilita o melhor manejo e a exploração dos reprodutores de destacado potencial genético (Amann, 1970; Amann e Schambacher, 1983; França, 1991), além de fornecer dados biológicos importantes na determinação de programas de reprodução assistida em espécies ameaçadas. Para se avaliar a produção espermática vários métodos têm sido utilizados, dentre os quais

podem ser citados aqueles que se baseiam na histologia quantitativa dos testículos, na estimativa da reserva espermática testicular através da contagem hemocitométrica de células espermáticas em homogeneizados do parênquima testicular, na quantificação de espermatozóides ejaculados e na colheita de espermatozóides diretamente através de canulação do ducto deferente ou da rede testicular (Amann, 1970; Berndtson, 1977). A eficiência espermatogênica em mamíferos é dependente principalmente da duração da espermatogênese, da densidade volumétrica (%) de túbulos seminíferos no testículo, do número de gerações de espermatogônias e da eficiência do processo espermatogênico (França e Russell, 1998).

O número de espermátides arredondadas computadas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero do periquito australiano foi considerado como a população de espermatozóides, partindo-se do pressuposto que durante o processo espermiogênico não há perdas significativas (Russell e Clermont, 1977). A população de espermátides arredondadas por secção transversal de 4µm de espessura de túbulo seminífero em periquito australiano foi em média 176,56 células (Tabela 5), e foi registrado cerca de 12,48 metros de túbulo por grama de testículo (Tabela 3). Assim, um montante de 275,9 x 10<sup>6</sup> espermatozóides são produzidos em ambos os testículos perfazendo um total de 551,7 x 10<sup>6</sup> espermatozóides produzidos por grama de testículo em periquitos australianos. Como este montante é produzido durante um ciclo do epitélio seminífero que dura cerca de 1,66 dias, a produção espermática diária é de 171,3 x 10<sup>6</sup> com cerca de 342,7 x 10<sup>6</sup> espermatozóides produzidos por grama de testículo por dia em periquito australiano (Tabela 7). A produção espermática em periquitos australianos é cerca de 10 vezes superior à média descrita para todos os mamíferos investigados (França e Russell, 1998), porém com uma duração cerca de 10 vezes menor.

#### 4.0 – CONCLUSÕES

1 - O índice gonadosomático (1,4%) registrado foi superior ao IGS para a maioria das aves estudadas durante o período reprodutivo.

2 - A proporção volumétrica registrada para os túbulos seminíferos (97%) encontra-se entre as mais altas observadas para aves.

3 - Os valores de diâmetro médio do túbulo seminífero (314  $\mu\text{m}$ ) e a altura do epitélio seminífero (96,7  $\mu\text{m}$ ) foram intermediários entre aqueles para aves silvestres e aves de produção.

4 - Observou-se cerca de 12,4 metros de túbulo seminíferos por grama de testículo, valor este dentro da amplitude observada em mamíferos domésticos.

5 - O arranjo celular ao longo do ciclo do epitélio seminífero foi semelhante àquele descrito em mamíferos, sendo possível a definição de 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero por meio da adaptação do método da morfologia tubular.

6 - Assim como nas demais espécies de aves estudadas, de cinco a nove áreas com estádios distintos foram observados em uma única secção transversal do túbulo seminífero.

7 - A frequência relativa dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero foi: estágio 1 (10,76 $\pm$ 1,09); estágio 2 (6,70 $\pm$ 4,36); estágio 3 (32,53 $\pm$ 18,81); estágio 4 (12,83 $\pm$ 0,28); estágio 5 (26,06 $\pm$ 1,24); estágio 6 (19,30 $\pm$ 4,20); estágio 7 (7,00 $\pm$ 1,31) e estágio 8 (4,36 $\pm$ 0,93). Os estádios pré divisionais ou pré meióticos somaram 40,8%, o divisional ou meiótico 11% e os estádios pós divisionais ou pós meióticos somaram 48,2%.

8 - A duração do ciclo do epitélio seminífero foi de 1,66 dias, menor que em todos os mamíferos e aves estudadas.

9 - Nas áreas correspondentes ao estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, foram observados valores corrigidos médios de 55,42 espermatogônias, 53,01 espermatócitos jovens, 44,68 espermatócitos velhos, 176,56 espermátides arredondadas e 7,06 células de Sertoli.

10 - Os valores de reserva espermática (275,9  $\times 10^6$ ), produção espermática diária (171,3  $\times 10^6$ ) e produção espermática diária por grama de testículo (342,7  $\times 10^6$ ) apresentam superiores aos de qualquer animal estudado e sem precedentes em aves.

11 - Foi observada perda de aproximadamente 16% de espermatócitos durante a prófase meiótica.

12 - A perda registrada de espermátides arredondadas durante as divisões meióticas não foi significativa sendo que das quatro células esperadas, cerca de 3,95 espermátides foram produzidas.

13 - Cada célula de Sertoli no epitélio seminífero foi capaz de sustentar e manter 46,72 células da linhagem germinativa, das quais 25,02 eram espermátides arredondadas.

## 5.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie, M. 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.* 94: 238-248.
- Aire, T.A., Olowo-Okorum, M.O., Ayeni, J.S. 1980. The seminiferous epithelium in the guinea fowl *Numida meleagris*. *Cell Tiss. Res.* 205: 319-325.
- Amann, R.P., Almquist, J.O. 1961. Reproductive capacity of dairy bulls. I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal sperm reserves. *J. Dairy Sci.* 44: 1537-1543.
- Amann, R.P. 1970. Sperm production rates. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (ed). *The testis*. New York: Academic Press. pp. 433-482.
- Amann, R.P., Schanbacher, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci. Suppl.* 57: 380-403.
- Amoroso, L., Artoni, S.M.B., Moraes, V.M.B., Perecin, D., Franzo, V.S., Amoroso, P. 2008. Influência da espermatogênese e dos níveis de testosterona no aspecto reprodutivo de codornas. *R. Bras. Zootec.* 37: 61-66.
- Artoni, S.M.B., Orsi, A.M., Carvalho, T.L., Vicentini, C.A., Stefanini, M.A. 1999. Seasonal morphology of the domestic quail (*Coturnix coturnix japonica*) testis. *Anatomy histology embryology.* 26: 337-339.
- Azevedo, M.H.F., Paula, T.A.R, Matta, S.L.P, Fonseca, C.C., Neves, M.T.D. 2006. Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça-pintada (*Panthera onca*). *Revista Ceres.* 53: 374-381.
- Azevedo, M.H.F., Paula, T.A.R, Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Costa, E.P., Costa, D.S., Peixoto, J.V. 2010. Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). *Anim. Reprod. Sci.* 118: 83-88.
- Balarini, M.K. 2008. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775) adulto. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 60p.
- Barros, J.B.G., Paula, T.A.R., Azevedo, M.H.F., Guião Leite, F.L., Rossi Jr, J.L., Matta, S.L.P., Oliveira, P.C. 2004. Population of the seminiferous epithelium,

- intrinsic yield of spermatogenesis and Sertoli cells index in adult lions (*Panthera leo*) raised in captivity. 5<sup>th</sup> International symposium on canine and feline reproduction. Rio de Janeiro. pp. 166-168.
- Barros, J.B.G., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Guião Leite, F.L., Rossi Júnior, J.L., Oliveira, P.C., Costa, E.P. 2007. Intrinsic yield of spermatogenesis process, the Sertoli cell index and spermatid reserves in adult captive African lions (*Phanthera leo*, Linnaeus, 1758). *Anim. Reprod. Sci.* 102: 350-356.
- Berndtson, W.E., Squires, E.L., Thompson Jr., D.L. 1983. Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. *Theriogenology*. 20: 449-457.
- Berndtson, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.* 44: 818-883.
- Bittencourt, V.L., Paula T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D., Costa, M.E.L., Malta, M.C., Coelho, C.M., Bastos, J.A.B. 2004. Avaliação da população celular do epitélio seminífero e índices indicativos da população espermática, através de biópsia testicular em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, ILIGER, 1811) adulto. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 28: 108-113.
- Bittencourt, V.L., Paula T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Costa, D.S., Benjamim, L.A., Costa, E.P. 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatid production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, ILIGER, 1811). *Micron*. 38: 584-589.
- Caldeira, B.C. 2007. Análise morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766) adulto. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 48p
- Clermont, Y. 1958. Structure de l'épithélium séminal et mode de renouvellement des spermatogonies chez le canard. *Archs Anat. Microsc. Morph.* 47: 47-66.
- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52: 198-236.
- Costa, D.S., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P. 2006. Cat, colgar and jaguar spermatogenesis: a comparative analysis. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49: 725-731.

- Costa, D.S., Menezes, C.M.C., Paula, T.A.R. 2007. Spermatogenesis in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). Anim. Reprod. Sci. 98: 322-334.
- de Reviere, M. 1968. Determination de la durée des processus spermatogénétiques chez le coq à l'aide de thymidine tritice. 6<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. Paris. 1: 183-185.
- de Reviere, M. 1971. le développement testiculaire chez le coq. I Croissance pondérale des testicules et développement des tubes séminifères. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 11: 519-530.
- de Rooij, D.G. Janssen, J.M. 1987. Regulation of the density spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: I. Undifferentiated spermatogonia. Anat. Rec. 217: 124-130.
- de Rooij, D.G. 1998. Stem cells in the testis. Int. J. Exp. Path. 79: 67-80.
- Dixon, A., Birkhead, T.R. 1997. Reproductive anatomy of the reed bunting: a species which exhibits a high degree of sperm competition through extra-pair copulations. Condor. 99: 966-969.
- França, L.R., Russell, L.D. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). Male reproduction. A multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Livingstone. pp. 197-219.
- França L.R., Godinho, C.L. 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). Biol. Reprod. 68: 1554-1561.
- França, L.R., Ogawa, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L., Russell, L.D. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. Biol. Reprod. 59: 1371-1377.
- França, L.R., Becker-Silva, S.C., Chiarini-Garcia, H. 1999. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). Tiss. Cell. 31: 274-280.
- França, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 185p.

- Godinho, C.L. 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Dissertação (Mestrado em Morfologia), 124p.
- Griswold, M.D. 1995. Interaction between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.* 52: 211-216.
- Guião Leite, F.L., Paula, T.A.R. 2003. Rendimento Intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a reprodução espermática diária da onça-parda (*Puma concolor*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 27: 21-26.
- Gunn, M.R., Champion, Z., Casey, M.E., Teal, P., Casey, P.J. 2008. Testicular and spermatozoan parameters in the pukeko (*Porphyrio porphyrio melanotus*). *Anim. Reprod. Sci.* 109: 330-342.
- Huckins, C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.* 190: 905-26.
- Immelmann, K. 1971. Ecological aspects of periodic reproduction. In: Farner, D.S., King, J.R. *Avian biology*. New York: Academic Press. pp. 341-389.
- Johnson, L., Varner, T.L., Keillor, G.E., Scrutchfield, W.L. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 471-480.
- Jones, R.C., Lin, M. 1993. Spermatogenesis in birds. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 15: 233-264.
- Kenagy, G.J., Trombulak, S.C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J. Mamm.* 67: 1-22.
- Kirby, J.D., Froman, D.P. 2000. Reproduction in male. In: Whittow, G.C. *Sturkie's avian physiology*. 5<sup>th</sup>. Hawaii: Elsevier. pp. 597-615.
- Lake, P.E. 1981. Male genital organs. In: *Form and function in birds*, Vol. 2. (ed. A.S. King and McLelland). Academic Press, London. pp. 1-61.
- Lin, M., Jones, R.C. 1992. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Cell Tissue Res.* 267: 591-601.

- Lin, M., Jones, R.C. 1990. Spatial arrangement of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail. *Coturnix coturnix japonica*. J. Reprod. Fertil. 90: 361-367.
- Lofts, B., Murton, R.K. 1973. Reproduction in birds. In: Farner, D.S., King, J.R. Avian biology. New York: Academic Press. v.3. pp. 1-107.
- Noirault, J. Brillard, J.P., Bakst, M.R. 2005. Spermatogenesis in the turkey (*Meleagris gallopavo*): quantitative approach in immature and adult males subjected to various photoperiods. Theriogenology. 65: 845-859.
- Peixoto, J.V. 2006. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma* Muller, 1776) adulto, mantido em cativeiro, nas diferentes estações do ano. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 39 p.
- Pereira, K.S., Maruch, S.M.G., Ribeiro, M.G., Teles, M.E.O. 1994. Morfologia do testículo de *Numida meleagris* (Linné, 1758) Numididae – Galliformes. BIOS – Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC-MG. 2: 19-24.
- Queiroz, G.F., Cardoso, F.M., 1989. Histological evaluation of the spermatogenesis yield in adult hairy rams. Rev. Bras. Reprod. Anim. 13: 99-108.
- Roosen-Runge, E.C. 1977. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge: University Press. 272 p.
- Russell, L.D., Peterson, R.N. 1984. Determination of the alongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. J. Reprod. Fert. 70: 635-641.
- Russell, L.D., Clermont, Y. 1977. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. Anat. Rec. 187: 347-366.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D. 1990a. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, Florida. 286 p.
- Russell, L.D., Ren, H.P., Sinha-Hikin, I., Schulze, W., Sinha-Hikin, A.P. 1990b. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. Am. J. Anat. 188: 21-30.

- Samour, J.H. 2002. The reproductive biology of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*): semen preservation techniques and artificial insemination procedures. J Avian Med Surg. 16: 39-49.
- Sarti, P. 2006. Avaliação Morfométrica do Testículo e da Espermatogênese de Jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) Adultas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. 66p.
- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In. Knobil, E. & Neil, J.D. (eds) The physiology of reproduction, 2ed. Raven Press. N.Y. pp. 1363-1434.
- Shimada, A., Shibata, T., Komatsu, K., Nifuji, A. 2008. Improved methods for immunohistochemical detection of BrdU in hard tissue. J. Immunol. Methods. 339:11-16.
- Sick, H. 1997. Ornitologia Brasileira. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira. 912 p.
- Tae, H.J., Jang, B.G., Ahn, D.C, Choi, E.Y., Kang, H.S., Kim, N.S., Lee, J.H., Park, S.Y., Yang, H.H., Kim, I.S. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karkpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. Vet Res Commun. 29: 629-643.
- Wing, T.Y., Christensen, A.K. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubule. Am. J. Anat. 165: 13-25.
- Woolley, P. 1975. The seminiferous tubules in dasyurid marsupials. J. Reprod. Fertil. 45: 255-261.
- Yamamoto, S., Tamate, H. & Itikawa, O. 1967. Morphological studies on the sexual maturation in the male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). 2. The germ cell types and cellular associations during spermatogenesis. Tohoku J. Agric. Res. 18: 27-37.